

## 疲労困憊に至る運動が筋小胞体 ATPase に及ぼす影響

## — 短時間運動と長時間運動の比較 —

稲嶋 修一郎\*    安田 俊広\*\*    稲水 惇\*\*\*  
 和田 正信\*    勝田 茂\*\*

EFFECTS OF EXHAUSTIVE EXERCISE ON SARCOPLASMIC  
 RETICULUM ATPase  
 — COMPARISON OF SHORT- AND LONG-TERM EXERCISE —

SHUICHIRO INASHIMA, TOSHIHIRO YASUDA, ATSUSHI INAMIZU,  
 MASANOBU WADA and SHIGERU KATSUTA

## Abstract

Effects of short-term, high-intensity and long-term, moderate-intensity exercise on biochemically assessed sarcoplasmic reticulum (SR) ATPase protein were analyzed in muscle homogenates of the rat after treadmill runs to exhaustion (avg. time to exhaustion 2 min 48 sec and 1 h 29 min, respectively). The exercise-induced changes in SR  $Ca^{2+}$ -ATPase activity were muscle type-specific. After short-term exercise, a decrease in the activity occurred in the soleus muscle and the superficial region of the vastus lateralis muscle whereas long-term exercise depressed the rate of ATP hydrolysis in the soleus muscle and the deep region of the vastus lateralis muscle. The concentration of fluorescein isothiocyanate, a competitor at the ATP-binding site, for 50% inhibition of SR  $Ca^{2+}$ -ATPase activity fluctuated only in the soleus muscle subjected to short-term exercise; it was increased by 31%. This change occurring in the soleus muscle would elevate SR  $Ca^{2+}$ -ATPase activity at a given concentration of ATP. The results presented here suggest that acute short-term exercise to exhaustion may exert a remarkably inhibitory factor on SR  $Ca^{2+}$ -ATPase protein of slow-twitch muscle, which can overcome the positive effect probably arising from the phosphorylation of the phospholamban.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 1998, 47: 63~72)

**key words** : muscle fatigue, skeletal muscle,  $Ca^{2+}$ -ATPase, sarcoplasmic reticulum, exercise

## I. 緒 言

一定の強度で運動を続けようと試みても、筋が次第に疲労するため、それを長時間にわたり継続するのは現実には不可能である。生理学的には、筋疲労とは「一定の張力を発揮し続けることができなくなる」と定義されてきた。実際、筋収縮を繰り返して行くと、最大張力の低下あるいは最大張力到達速度や 1/2 弛緩速度の遅延などが起

こることが報告されている<sup>1)</sup>。

筋の収縮活動は、細胞質内遊離カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) 濃度によって制御されており、 $Ca^{2+}$  濃度が 1~10  $\mu$ M に増大すると筋は収縮を開始し、0.1  $\mu$ M に低減すると弛緩する。細胞質内の  $Ca^{2+}$  濃度は、袋状膜構造をなす筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) によって調節されている。 $Ca^{2+}$  の取り込みは、SR  $Ca^{2+}$ -ATPase が ATP を加水分解する際に得られるエネルギーを用い能動的に

\* 広島大学総合科学部  
 〒739 広島県東広島市鏡山1-7-1

\*\* 筑波大学体育科学系  
 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

\*\*\* 広島大学教育学部  
 〒739 広島県東広島市鏡山1-1-2

Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University  
 1-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739

Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba  
 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305

Faculty of Education, Hiroshima University  
 1-1-2 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739

行われ, ATP 1分子の分解によって  $\text{Ca}^{2+}$  2分子がSRに取り込まれる。

これまで筋疲労を招来する要因として, グリコーゲンの枯渇<sup>2)</sup>, 筋中乳酸の蓄積<sup>3)</sup>, 興奮収縮連関の不全<sup>1)</sup>あるいは個々のクロスブリッジの機能の低下<sup>4)</sup>などが示されてきたが, 筋収縮においてSRの担う重要な役割から考え, これらに加えSRの構造的・機能的変化も, 筋疲労に関与していると思われる。事実, 疲労困憊に至る運動直後では, SRの $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能力は著しく低減することが報告されている<sup>5,6)</sup>。SRの機能が低下する成因としては, (1)基質の変化, (2)pHの低下, (3)筋温の上昇, (4)活性酸素の生成, あるいは(5)細胞質中 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇などが推察されてきたが<sup>7,8)</sup>, 明確な機序については必ずしも解明されていない。

疲労困憊に至る運動直後では, 運動強度が高くても低くても, どちらの場合においてもSRの機能に低下が起こることが報告されている<sup>3,6)</sup>。しかしながら, 高強度・短時間運動と低強度・長時間運動とでは, 筋内で生じる生化学的変化は同一ではなく, これらのことは, 運動によるSRの機能低下の要因は両タイプの運動間で異なる可能性を示唆する。そこで, 本研究では疲労困憊に至るランニングに起因するSRの生化学的変化の様相を, 両タイプの運動で比較検討することを目的とした。

## II. 実験方法

### A. 実験動物および運動プロトコール

実験にはWistar系雄ラット18匹を用いた。水と飼料(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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ に常時維持した飼育室において飼育した。3週齢時から飼育を始め, 1週間の予備飼育の後, 小動物用トレッドミル(夏目製作所製, KN-73)での走行に馴れさせるため, 以下のような走行練習を全てのラットに行わせた。4週齢時には勾配10%, 20 m/minの速度で10分間, 5~7週齢時には勾配10%, 20 m/minでまず5分間, その後速度を30 m/minにあげ, さらに5分間, そして

最後の10数秒間は50 m/minで走行させた。なお, 7週齢時までは週3回, 8~10週齢時には, 5~7週齢時と同じ内容を週2回に減らして行わせた。これらの走行練習はあくまでトレッドミル走行に馴れさせるためであり, トレーニング効果をねらったものではない。

これらのラットを, コントロール(control; C)群( $n=6$ )と疲労困憊に至るまでランニングを行わせる運動群とに分けた。さらに, 運動群を勾配10%, 速度50 m/minでランニングする短時間運動(short-term exercise; SE)群( $n=6$ )と勾配10%, 速度20 m/minでランニングを行う長時間運動(long-term exercise; LE)群( $n=6$ )とに分け, この運動を10~12週齢時に行わせた。この運動強度は, BrookeとWhite<sup>9)</sup>の報告から算出すると, SE群で約100%  $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ に, LE群で約75%  $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ に相当する。

### B. 被検筋および筋タンパクの抽出

被検筋には, ランニング時の主働筋であり, 筋線維組成が筋間で異なる外側広筋表層部, 外側広筋深層部およびヒラメ筋を用いた。ランニングが終了したラットをジエチルエーテルを用いたオーバードースによって屠殺し, 両後肢より筋を摘出した。摘出した筋の片方をSR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性の分析に, もう片方を筋中乳酸濃度の分析に用いた。SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性測定のためには, 摘出後直ちにガラスホモジナイザーを用い, 10倍(mass/vol.)の抽出液(40 mM Tris, 300 mM sucrose, pH 7.9)で筋をホモジナイズした。これらを液体窒素で瞬間凍結した後,  $-80^\circ\text{C}$ の条件下で保存し, 分析に用いた。

### C. 分析項目

#### 1. SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性値は, SimonidesとHardeveld<sup>10)</sup>の方法に一部修正を加えたものを用い, 筋のホモジネイトから測定した。用いた反応溶液の組成は, 1 mM EGTA, 20 mM HEPES, 200 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{NaN}_3$ , 0.4 mM NADH, 10 mM phosphoenolpyruvate, 18 U/ml pyruvate kinase, 18 U/ml lactate dehydrogenase (LDH), 0.8 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.5)であった。測定は

37°Cで行い、4 mM (最終濃度) の ATP を加えることによって反応をスタートさせた。反応開始、2分後および4分後に、NADH の濃度を分光光度計 (日本分光社製, UVIDE-660) を用いて測定した (波長 340 nm)。その後、 $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を 2 mM (最終濃度) にし、上記と同様にして NADH の濃度を測定した。高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) は、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のみを特異的に抑制する。したがって、初期の NADH の減少率と高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  を加えた後の減少率の差が、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を示すことになる。

SR の膜の状態を検討するために、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、4-ブロモカルシウムイオノフォア (シグマ, A 23187) を加えた場合についても測定した (最終濃度 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対して、SR 内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が抑制因子の 1 つとなっており、内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いほど SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は抑制されることが知られている<sup>6)</sup>。カルシウムイオノフォアは、SR の膜の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する透過性を高める働きがあり、こ

の試薬に SR を暴露すると、膜が正常に機能している場合は、内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低減するため SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は増加する (図 1)。これに対して、膜が損傷を受け  $\text{Ca}^{2+}$  を貯蔵する能力が低減している場合は、既に内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は低下しているため、カルシウムイオノフォアに暴露しても SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は変化することはない。

また、SR の ATP 結合部位の変化を検討するために、ATP の競合物質である fluorescein isothiocyanate (FITC) を 25~100  $\mu\text{M}$  加え、10 分間インキュベーションした後の活性値についても測定した。

## 2. 筋中乳酸値

筋中乳酸値は Lowry と Passonneau<sup>11)</sup> の方法に従って測定した。摘出した筋を凍結乾燥機 (タイテック社製, VD-16) で一晩凍結乾燥し (-70°C)、その後室温でさらに数時間乾燥を続けた。結合組織を取り除き、液体窒素中でパウダーにした後、筋重量を測定し、予め冷却した 2 M perchloric acid を 300  $\mu\text{l}$  加え、クーリングポンプ (タイテッ

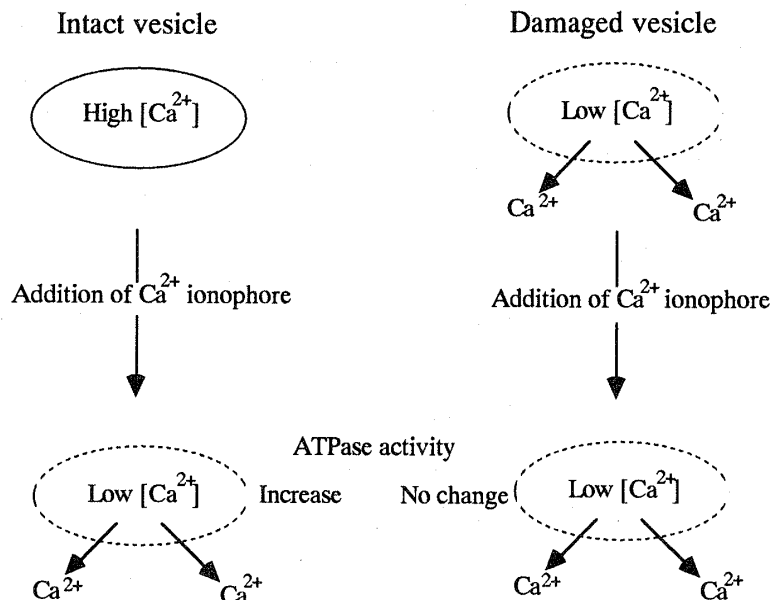


Fig. 1. Illustration of the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore on sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. Accumulation of intravesicular  $\text{Ca}^{2+}$  inhibits SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. Incubation of SR in the reaction medium containing  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore elicits an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of the vesicle membrane. Only intact vesicles display an increase in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity since the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) in the vesicle is lowered by backflux of  $\text{Ca}^{2+}$  across the vesicle membrane. In contrast the treatment with  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore does not elevate SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of damaged vesicles that are incapable of sequestering  $\text{Ca}^{2+}$ .

ク社製, CP-80)で約 $-10^{\circ}\text{C}$ に保った水中に数分置いた。0 $^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離(2,000g)した後, 上清を250 $\mu\text{l}$ 取り, これに2MKHCO<sub>3</sub>を250 $\mu\text{l}$ 加え中和し, その後さらに10分間遠心分離(2,000g)を行った。この上清350 $\mu\text{l}$ に100mM KHCO<sub>3</sub>(pH 7.5)を650 $\mu\text{l}$ 加えたものをサンプルとして用いた。試験管に反応溶液(100mM hydradine, 100mM 2-amino-2-methyl-1-propanol, 0.5mM NAD, pH 10.0)を2ml取り, サンプルを20 $\mu\text{l}$ , 250U/ml LDHを66.8 $\mu\text{l}$ (最終濃度8U/ml)加えた。暗所に60分間放置した後, 分光蛍光光度計(島津製作所製, RF-5000)を用い, 励起波長340nm, 蛍光波長460nmにて蛍光値を測定した。

#### D. 統計処理

統計量は, 平均 $\pm$ 標準偏差で示した。各群間の比較には一元配置の分散分析を用い, 有意なF値が検出されたものについては, Scheffeの方法により統計学的有意性を検討した。また, 各群内におけるカルシウムイオノフォア不在下と存在下の比較は, Paired-t-testを用いて行った。なお, 有意水準は $P < 0.05$ とした。

### III. 実験結果

#### A. 運動時間および筋水分含有量

表1に各運動群の運動時間を示した。SE群においては平均2分48秒 $\pm$ 44秒(最大3分58秒, 最低2分10秒), また, LE群においては平均1時間29分 $\pm$ 30分(最大2時間5分, 最低55分)であった。

表2に各群の筋水分含有率を示した。ヒラメ筋では, 3群間に統計的に有意な差異はみられなかったが, 外側広筋深層部および表層部で, SE群においてC群およびLE群に対して有意な高値が認められた。

#### B. 筋中乳酸濃度

図2にC群と運動終了後における各運動群の筋中乳酸濃度を示した。ヒラメ筋では各群間に統計的に有意な差異はみられなかった。一方, 外側広筋深層部では, SE群がLE群に対し高値( $P < 0.05$ )を示した。また, 外側広筋表層部では, SE

Table 1. Duration to exhaustion at treadmill running with two different intensities.

	SE (n=6)	LE (n=6)
Means	2 min 48 sec	1 h 29 min
SD	44 sec	30 min
Maximum	3 min 58 sec	2 h 05 min
Minimum	2 min 10 sec	55 min

n, number of samples. The rats of short-term exercise (SE) and long-term exercise (LE) groups were run at 10% grade with intensities of 50 m/min and 25 m/min, respectively.

Table 2. Percent water of the soleus muscle (SOL) and the deep (VD) and superficial (VS) regions of the vastus lateralis muscle from control (C), short-term exercise (SE), and long-term exercise (LE) rats.

	SOL	VD	VS	
n	%			
C	5	76.7 $\pm$ 0.8	75.3 $\pm$ 0.9	75.6 $\pm$ 0.7
SE	6	75.3 $\pm$ 1.3	76.9 $\pm$ 0.6*#	78.2 $\pm$ 0.7*#
LE	6	76.2 $\pm$ 0.4	75.0 $\pm$ 0.5	76.2 $\pm$ 0.6

Values are means  $\pm$  SD; n, number of samples. \* $P < 0.05$  for C vs. SE. # $P < 0.05$  for SE vs. LE.

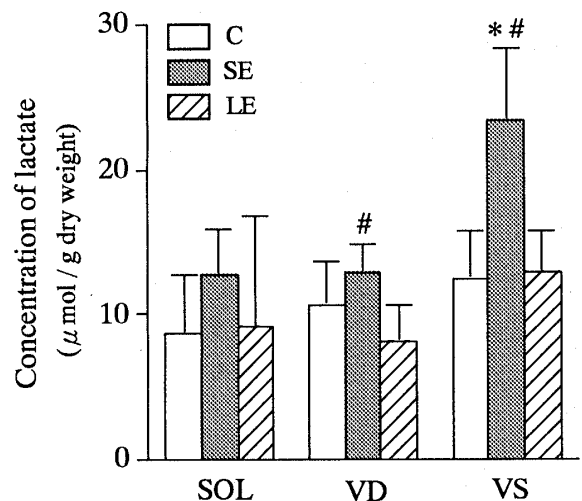


Fig. 2. Concentration of lactate in the soleus muscle (SOL) and the deep (VD) and superficial (VS) regions of the vastus lateralis muscle from control (C), short-term exercise (SE), and long-term exercise (LE) rats. Values are means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  for C vs. SE. # $P < 0.05$  for SE vs. LE.

群において他の群と比べ著しい高値が観察され, その値はC群より87.2%, LE群より81.4%高い値が示された。

Table 3. Sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore in the soleus muscle (SOL) and the deep (VD) and superficial (VS) regions of the vastus lateralis muscle from control (C), short-term exercise (SE), and long-term exercise (LE) rats.

Muscle	Group	n	-ionophore		+ionophore	+/-
			( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ )			
SOL	C	5	11.9±1.1	16.7± 2.4§	1.40±0.09	
	SE	6	9.7±1.3*	14.2± 1.6§	1.48±0.18	
	LE	6	10.1±0.6**	14.5± 1.3§	1.42±0.12	
VD	C	6	21.3±1.1	34.5± 2.6§	1.71±0.17	
	SE	6	18.6±3.1	32.0± 9.2§	1.70±0.26	
	LE	6	15.9±1.9**	28.8± 4.2§	1.82±0.12	
VS	C	6	33.6±2.4	52.5± 9.6§	1.49±0.18	
	SE	6	22.5±4.8*#	38.4±11.9§	1.58±0.27	
	LE	6	34.3±8.8	64.2± 4.7§	1.96±0.42**	

Values are means  $\pm$  SD; n, number of samples. A ratio (+/-) of SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in presence (+) of ionophore to the activity in absence (-) of ionophore > 1.0 indicates that SR vesicles are stimulated in presence of ionophore. Statistical analyses are not performed to evaluate differences in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities in presence of ionophore among groups. \* $P < 0.05$  for C vs. SE. \*\* $P < 0.05$  for C vs. LE. # $P < 0.05$  for SE vs. LE. § $P < 0.05$  - vs. +.

### C. SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性

カルシウムイオノフォア不在下での SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、実験に用いられた全ての筋において、運動による低下がみられた(表3)。ヒラメ筋では、C群に対し SE 群で18.5%、LE 群で15.1%の有意な低値が示された。外側広筋深層部では、C群と比較して LE 群では25.4%低い値であった。また、外側広筋表層部では、SE 群ではコントロール群に対し33.0%、LE 群に対し34.4%の低値が観察された。

カルシウムイオノフォアを加えることによって、全ての群において SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は増加し、その増加率はヒラメ筋で40~48%、外側広筋深層部で70~82%、また外側広筋表層部で49~96%であった。この増加率には、外側広筋表層部においてC群と LE 群との間に有意な違いがみられた以外には、各群間には差異は認められなかった。

図3に SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を50%に失活させるのに必要とされた FITC の濃度を示した。ヒ

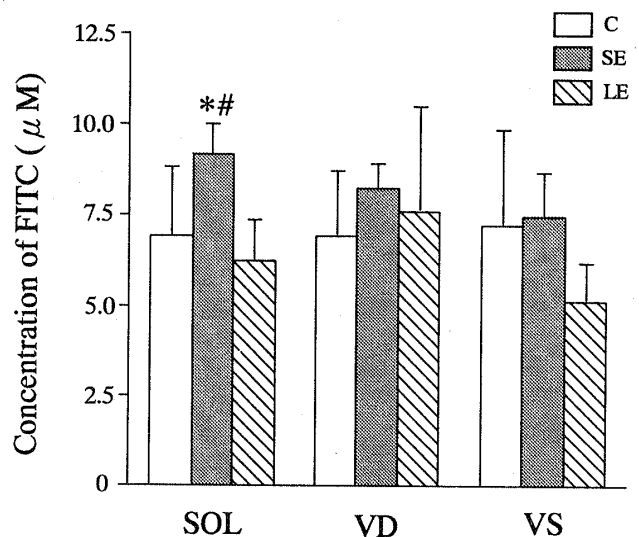


Fig. 3. Concentration of fluorescein isothiocyanate (FITC) for 50% inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in the soleus muscle (SOL) and the deep (VD) and superficial (VS) regions of the vastus lateralis muscle from control (C), short-term exercise (SE), and long-term exercise (LE) rats. Values are means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  for C vs. SE. # $P < 0.05$  for SE vs. LE.

ラメ筋では, SE 群においてC群およびLE群と比べ有意な高値が認められた. しかしながら, 外側広筋深層部および表層部では各群間に有意な差異は観察されなかった.

#### IV. 考 察

筋形質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を制御している SR の機能が, 疲労困憊に至る運動後において低下することは, 今までに幾つか報告されてきており<sup>3,5,6,12~14)</sup>, 本研究においてもこれらと一致した結果が得られた(表3). 筋線維内には SR だけでなく, ミトコンドリア, 筋原線維あるいは筋鞘など多くの部位に ATPase が存在するため, 先行研究の大部分では<sup>3,6,15~18)</sup>, 超遠心法やサッカロス沈殿法などにより精製した SR が試料として用いられてきた. しかしながら, タイプが異なる筋から SR を精製すると, 試料に混在する SR 以外のタンパクの比率に差異がみられること, また何らかの要因により筋細胞内の膜の特性が変化すると同じタイプの筋であっても, この比率が変化することなどが認められており, 精製した SR から得られたデータの妥当性を疑問視する指摘がなされている<sup>19)</sup>. これらをふまえ, 本研究では高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  によって SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のみが特異的に抑制されることを利用した Simonides と Hardeveld<sup>10)</sup> の方法を用い, ホモジネイトから SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定した. この場合, 運動により筋の水分含有量が増加し, それが湿重量当たりで表した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を低減させることが懸念されるが, 表2に示されるように運動によって起こる水分含有量の変化は2~3%程度と極めて小さく, これにより表3に示される結果が大きく左右されるとは思われない.

SR の機能低下の要因の1つとしては, 虚血後の再還流時<sup>20)</sup>および運動中に発生することが知られているフリーラジカルによる影響が考えられる<sup>7)</sup>. SR やミトコンドリアにおける超微細構造の変化の様相が, 虚血, 高強度・短時間運動あるいは低強度・長時間運動で類似しているとする知見は興味深く<sup>21)</sup>, このことはフリーラジカルの発生が, 共通した要因であることを示唆する. フ

リーラジカルは, 2通りの方法で SR に直接影響することが認められている. 1つは SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の SH 基を酸化することであり, もう1つは脂質膜にダメージを与えることであり, 何れも SR の機能が低下する成因となると考えられている<sup>22)</sup>.

このような SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase への直接の作用のほかに, フリーラジカルがリソソームを破壊し, 間接的に SR の機能を低下させている可能性がある. リソソームは多種の加水分解酵素を含んでおり, この酵素はタンパク質あるいはその他の高分子化合物を低分子の構成単位にまで分解する働きがある. リソソームの膜がフリーラジカルによって破壊されれば分解酵素が放出され, SR がダメージを受けることはありうる. しかしながら, この過程には5分以上を要すると考えられており<sup>3)</sup>, SE 群の運動時間は最大でも3分58秒であり(表1), このような短時間で終わる様式の運動では, リソソームを介した過程は大きく作用しないであろう. これに対して, 1時間以上も継続する様式の運動では, リソソームを介した過程によって SR がダメージを受けることは十分考えられ, このことが LE 群において SR の機能が低下した要因の1つなのかもしれない.

*in vitro* において, pH 6.0 の条件下では SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のリン酸化速度は減少することを示す Mandel たちの報告は<sup>8)</sup>, pH の低下が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパクに何らかの構造的変化をもたらすことを示唆する. 本実験においても, 筋中乳酸値に著しい増加が観察された SE 群の外側広筋表層部において, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が大きく低下したことが示された(図2および表3). しかしながら, 本研究では pH 7.9 に調整した溶液で筋を洗浄・抽出し, pH 7.5 の条件下で SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定した. したがって, 高強度運動によって筋形質中の pH が低下していたとしても, 測定時には SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパクを取り囲む溶液の pH が酸性よりであったとは考えにくい. これらのことは, 筋中乳酸に変化がみられなかった筋においても SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性値が低下した事実とあわせ(表3), 生体内で

は pH の低下が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の機能低下の原因の1つであろうが、他にも要因が存在することを示唆する。

SR 内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いほど、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は抑制されることが明らかになっており、この現象は「back-inhibition」と呼ばれている。既に述べたように、この現象と SR の膜の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する透過性を高める働きがあるカルシウムイオノフォアを利用して、SR の膜の状態を検討することができる(図1)。表3に示されるようにカルシウムイオノフォア存在下では、全ての群において、不在下の値に対して SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が上昇したことから、本研究で用いた両タイプの運動は SR の膜に大きな影響を及ぼすことはなかったと考えられる。

本研究では、FITC 存在下における SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性値についても検討した。FITC は SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の結合部位に ATP と競合して結合することにより、ATP の加水分解速度を阻害する作用を有する物質である<sup>18,23)</sup>。Luckin たち<sup>14)</sup>は、本研究の LE 群に負荷したものとほぼ同様なランニングをラットに疲労困憊に至るまで行わせ、FITC の SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase への結合量が減少したことを報告しており、このことはランニングにより SR における ATP の結合部位に構造的変化が起こったことを示唆する。このような変化が一部の SR のみに起こり、その結果 SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低減が生じるとすると、活性値を50%減少させるのに必要な FITC の濃度([1/2-FITC])も減少するはずである。しかしながら、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に低下がみられた SE 群の外側広筋表層部および LE 群のヒラメ筋、外側広筋深層部には [1/2-FITC] には変化がみられず(図3)、これらの筋では正常に機能している SR と不全を起こしたものとが混在しているのではなく、ほとんど全ての SR に機能低下を招来する何らかの変化が生じたものと考えられる。

一方、SE 群のヒラメ筋においては、[1/2-FITC] は他の群と比較して有意な高値が観察された(図3)。この結果は、この筋において ATP と SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の結合部位との親和性が上がった

ことを示唆する。分子量 22~25 kDa であるフォスフォルランバン (phospholamban; PL) は、速筋には存在せず遅筋および心筋に特異的に存在しているタンパクであり、通常は SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に結合し、ATP の加水分解速度を抑制している。PL がリン酸化されると ATPase から解離し、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性が増大する。この親和性の増大により、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が高まることが知られている<sup>19)</sup>。このような現象が生じると、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の ATP に対する親和性もみかけ上、高まることになる。SE 群のヒラメ筋において観察された結果は(図3)、高強度運動が何らかの機序で PL のリン酸化を誘因したことに素因があると推察される。何れにせよ、ヒラメ筋におけるこの変化は SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を高めるよう作用するはずだが、それにもかかわらず活性値が低下した事実は、高強度運動がこの正の効果をはるかに上回る抑制因子をもたらすことを示唆する。

以上のことから、(1)高強度および低強度のどちらのタイプの運動も SR の膜には変化をもたらさないこと、(2)速筋では運動強度に関わりなく、ほぼ全ての SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase が修飾を受けているであろうこと、(3)高強度運動によって遅筋においては、PL が関与すると思われる正の作用を上回る抑制因子が、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパクに対してもたらされることが示唆された。

## V. 総 括

本研究では、疲労困憊に至るランニングに起因する筋小胞体 (SR) の ATPase タンパクの変化の様相について、高強度・短時間運動と低強度・長時間運動とを比較検討することを目的とした。Wistar 系雄ラットを勾配10%、速度50 m/min で走行させるグループ (SE 群) と勾配10%、25 m/min で走行させるグループ (LE 群) に分け、疲労困憊に至るランニングが SR に及ぼす影響を、ヒラメ筋、外側広筋表層部および深層部を対象に筋のホモジネイトから検討し、以下の結果を得た。

1. SE 群の平均運動時間は2分48秒±44秒、LE 群では1時間29分±30分であった。

2. SE 群の外側広筋表層部において, 他の群と比較して筋中乳酸値に有意な高値が認められた.
3. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は, コントロール (C) 群と比較して, SE 群ではヒラメ筋と外側広筋表層部, LE 群ではヒラメ筋と外側広筋深層部において有意な低値が観察された.
4. カルシウムイオノフォアを添加することにより, 全ての群において SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は増大した.
5. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を50%失活させるのに必要な FITC (fluorescein isothiocyanate) の濃度は, SE 群のヒラメ筋において他の2群と比べ, 有意な高値がみられた. 実験に用いた他の筋では, 変化が観察されなかった.

以上のことから, (1)高強度および低強度のどちらのタイプの運動も SR の膜の特性には変化をもたらさないこと, (2)速筋では運動強度に関わりなく, ほぼ全ての SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase が修飾を受けているであろうこと, (3)高強度運動によって遅筋においては, フォスフォランバンが関与すると思われる正の作用を上回る抑制因子が, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパクに対してもたらされることが示唆された.

(受理日 平成9年8月20日)

## 文 献

- 1) Bigland-Ritchie, B., Johansson, R., Lippold, O. C. J. and Woods, J. J. Contractile speed and EMG changes during fatigue of sustained maximal voluntary contractions. *J. Neurophysiol.*, (1983), **50**, 313-324.
- 2) Gollnick, P. D., Armstrong, R. B., Saubert-IV, C. W., Sembrowich, W. L., Shepherd, R. E. and Saltin, B. Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers during prolonged work. *Pflügers Arch.*, (1973), **344**, 1-12.
- 3) Byrd, S. K., McCutcheon, L., Hodgson, D. R. and Gollnick, P. D. Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.*, (1989), **67**, 2072-2077.
- 4) Edman, K. A. P. and Lou, F. Changes in force and stiffness induced by fatigue and intracellular acidification in frog muscle fibres. *J. Physiol.*, (1990), **424**, 133-149.
- 5) Fitts, R. H., Courtright, J. B., Kim, D. H. and Witzmann, F. A. Muscle fatigue with prolonged exercise: contractile and biochemical alterations. *Am. J. Physiol.*, (1982), **242**, C 65-C 73.
- 6) Byrd, S. K., Bode, A. K. and Klug, G. A. Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J. Appl. Physiol.*, (1989), **66**, 1383-1389.
- 7) Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1982), **107**, 1198-1205.
- 8) Mandel, F., Kranias, E. G., DeGende, A. C., Sumida, M. and Schwartz, A. The effect of pH on the transient-state kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.*, (1982), **50**, 310-317.
- 9) Brooke, G. A. and White, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.*, (1978), **45**, 1009-1015.
- 10) Simonides, W. S. and Hardeveld, C. An assay for sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in muscle homogenate. *Anal. Biochem.*, (1990), **191**, 321-331.
- 11) Lowry, O. H. and Passonneau, J. V. A flexible system of enzymatic analysis. New York: Academic, (1972).
- 12) Pierce, G. N., Kutryk, M. J. B., Dhalla, K. S., Beamish, R. E. and Dhalla, N. S. Biochemical alterations in heart after exhaustive swimming in rats. *J. Appl. Physiol.*, (1984), **57**, 326-331.
- 13) Gollnick, P. D., Korge, P., Karpakka, J. and Saltin, B. Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiol. Scand.*, (1991), **142**, 135-136.
- 14) Luckin, K. A., Favero, T. G. and Klug, G. A. Prolonged exercise induces structural changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, (1991), **46**, 391-405.
- 15) Heilmann, C., Brdiczka, D., Nickel, E. and Pette, D. ATPase activities,  $\text{Ca}^{2+}$  transport and phosphoprotein formation in sarcoplasmic reticulum subfractions of fast and slow rabbit muscles. *Eur. J. Biochem.*, (1977), **81**, 211-222.
- 16) Heilmann, C. and Pette, D. Molecular transformation in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch muscle by electro-stimulation. *Eur. J. Biochem.*, (1979), **93**, 437-446.
- 17) Leberer, E., Seedorf, U. and Pette, D. Neural control of gene expression in skeletal muscle: calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles. *Biochem. J.*, (1986), **239**, 295-300.
- 18) Leberer, E., Hartner, K.-T. and Pette, D. Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by



- altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.*, (1987), **162**, 555-561.
- 19) Dux, L. Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, (1993), **122**, 70-147.
- 20) Hess, M. L., Manson, N. H. and Okabe, E. Involvement of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, (1982), **60**, 1382-1389.
- 21) Wada, M. and Tsuchimochi, H. Dysfunction of sarcoplasmic reticulum by exercise. *Jpn. J. Sports Sci.*, (1996), **15**, 279-285.
- 22) Scherer, N. M. and Deamer, D. W. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.*, (1986), **246**, 589-601.
- 23) Pick, U. Interaction of fluorescein isothiocyanate with nucleotide-binding site of the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.*, (1981), **121**, 187-195.