

高強度運動後の回復期における筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み機能の変化 — 速筋と遅筋との比較 —

三島隆章¹⁾ 山田崇史¹⁾
坂本誠¹⁾ 和田正信²⁾

CHANGES IN SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -SEQUESTERING CAPACITY DURING RECOVERY FOLLOWING HIGH-INTENSITY EXERCISE : COMPARISONS BETWEEN FAST- AND SLOW-TWITCH MUSCLES

TAKAAKI MISHIMA, TAKASHI YAMADA, MAKOTO SAKAMOTO and MASANOBU WADA

Abstract

The purpose of this study was to investigate changes in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -sequestering capacity in rat fast-twitch plantaris (PL) and slow-twitch soleus (SOL) muscles during recovery after high-intensity exercise. The rats were subjected to treadmill runs to exhaustion at the intensity (10% incline at 50 m/min) estimated to require 100% of maximal O_2 consumption. The muscles were excised immediately after exercise, and 15, 30 and 60 min after exercise. Acute high-intensity exercise evoked a 27 % and 38 % depression ($P < 0.05$) in SR Ca^{2+} -uptake rate in the PL and SOL, respectively. In the PL, uptake rate remained lower ($P < 0.05$) at 30 min of recovery but recovered 60 min after exercise. These alterations were paralleled by those of SR Ca^{2+} -ATPase activity. On the other hand, SR Ca^{2+} -uptake rate in the SOL recovered 15 min after exercise. Unlike the PL, discordant time-course changes between SR Ca^{2+} -ATPase activity and uptake occurred in the SOL during recovery. SR Ca^{2+} -ATPase activities were unaltered with exercise and elevated ($P < 0.05$) by 25, 30 and 30% at 15, 30 and 60 min of recovery, respectively. These results demonstrate that SR Ca^{2+} -sequestering ability is restored faster in slow-twitch than in fast-twitch muscle during recovery periods following a single bout of high-intensity exercise and suggest that the rapid restoration of SR Ca^{2+} -sequestering ability in slow-twitch muscle could contribute to inhibition of disturbances in contractile and structural properties that are known to occur with raised myoplasmic Ca^{2+} concentrations.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2006, 55 : 503~512)

key word : Ca^{2+} homeostasis, muscle fatigue, fiber type

I. 緒 言

骨格筋において、カルシウムイオン (Ca^{2+}) は筋原線維の収縮・弛緩ばかりでなく、ある種の酵素の活性やタンパクの合成も制御しており、細胞の活動に重要な役割を果たしている物質であるともいえる。しかしながらその一方で、筋形質の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が高まると、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼの働きを介してタンパクの分解が促進され¹⁾、筋細胞の形態維持にマイナスに作用することもある。

したがって、細胞内の Ca^{2+} ホメオスタシスを維持することは、筋が正常に機能するうえで不可欠なことである。

骨格筋では、袋状膜構造をなす筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) が、筋形質 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の調節に対し主働的な役割を果たしており、通常、 Ca^{2+} は SR 内腔に蓄積されているため、筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $0.1 \mu\text{M}$ 以下に保たれている。SR による Ca^{2+} 放出は終末槽に存在する Ca^{2+} 放出チャネルによって、また、 Ca^{2+} 取り込みは縦走管上に点在する

¹⁾ 広島大学大学院生物圏科学研究科 Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University. 1-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521

²⁾ 広島大学大学院総合科学研究科 Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshiam University. 1-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8521

Ca^{2+} 依存性 ATPase (SR Ca^{2+} -ATPase) によってなされる。 Ca^{2+} 放出チャネルが開くと、拡散により Ca^{2+} が放出され筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は 10~100 倍に増加する。一方、 Ca^{2+} の取り込みは能動的に行われ、SR Ca^{2+} -ATPase が 1 mol の ATP を分解すると 2 mol の Ca^{2+} が内腔へと輸送される²⁾。このような SR の働きを考慮すると、SR の機能、とりわけ Ca^{2+} 取り込み能力が低下すると、筋細胞内の Ca^{2+} ホメオスタシスが変容することは容易に想像できる。

近年、運動強度が高い場合でも低い場合でも、疲労困憊に至るまで運動を行うと SR の Ca^{2+} 取り込み能力が低下することが、ラット^{3,4)}あるいはヒト^{5,6)}の骨格筋を用いた研究によって報告されている。これらの研究では運動後の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は測定してはいないが、電気刺激により収縮が誘起され、張力が低下したラット⁷⁾およびマウス⁸⁾の長指伸筋では、SR の Ca^{2+} 取り込み能力が低下するとともに、安静時 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加することが認められている。したがって、通常行う運動においても、運動後、正常な状態と比べ安静時 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高まっていることは十分に考えられる。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高く保たれた状態が継続すると、先に述べたようにタンパクの分解が促進されるうえに、横行小管に存在するディヒドロピリジンレセプターから Ca^{2+} 放出チャネルへのシグナル伝達に支障が生じるなどの変化も起こることが認められている⁹⁾。したがって、運動後の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化の様相を把握することは生理学的に重要な事柄ではあるが、細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度を直接測定するためには特殊な機器を必要とするため、必ずしも容易に行うことはできない。そこで多くの先行研究では^{3~6)}、 Ca^{2+} ホメオスタシスに大きな影響を及ぼす SR の機能を測定することで、この問題について検討してきた。しかしながら、これまでの先行研究のほとんどは、長時間運動後の回復過程について検討したものである¹⁰⁾。また、高強度運動に関するいずれの報告も^{5,11)}、運動後のある一時期のみの変化をみたものであり、回復過程を経時的に検討しているものではない。

これらのことから、本研究ではラットの骨格筋を用い、高強度運動後の回復期における SR の機能の変化を経時的に検討することを第一の目的とした。

また、速筋線維と遅筋線維とでは、筋活動に伴って細胞内で起こる生化学的反応は大きく異なり、そのため SR の機能の回復過程も異なることが予想される。そこで、速筋と遅筋とで回復の様相を比較することを第二の目的とした。

II. 実験方法

A. 被検動物および運動プロトコール

実験には Wistar 系雄性ラット 40 匹を用いた。水は自由摂取としたが、飼料(日本クレア製飼育繁殖固形飼料 CE-2)については、全てのラットの摂取量が一定になるように統制した。12 時間の明暗サイクルの照明下で温度 20~24℃ に常時維持した飼育室において飼育した。4 週齢時から飼育を始め、5 週齢時より全てのラットを対象にトレッドミル走に慣れさせるために、昇り勾配 10% で週に 2 回、8 週間走行練習を行わせた。トレーニング効果が現れないように、1 日の練習における走行時間は 5 分以内とした。

走行練習終了後、運動を行わせないコントロール (Control, CON; n=8) 群と疲労困憊に至るまでランニングを行わせる運動 (Exercise, E) 群に分けた。E 群をさらに 4 群 (E₀, E₁₅, E₃₀ および E₆₀ 群) に分け (各 n=8)、E₀ 群では運動直後に、また、E₁₅ 群では運動終了 15 分後、E₃₀ 群では 30 分後そして E₆₀ 群では 60 分後に筋を摘出した。走行条件は昇り勾配 10%、速度 50 m/min であり、この運動強度は Brooke and White¹²⁾ の報告から算出すると、ラットの最大酸素摂取量の 100% に相当するものである。E 群の疲労困憊に至るまでの走行時間の平均は、520 sec で群間に有意差は認められなかった。なお、本実験における実験の手順および方法については、広島大学動物実験委員会の承諾を得た。

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、主に速筋線維からなる足底筋 (plantaris, PL) および主に遅筋線維からなるヒラメ筋 (soleus, SOL) を用いた。これらの筋を摘出し、直ちにガラスホモジナイザーを用い 9 倍 (mass/vol.) の抽出液 (40 mM Tris, 300 mM sucrose, pH 7.9) でホモジナイズし、5,000 g で 20 分間遠心分離 (4℃) した後、上清を採取した。SR の構成要素は縦走管と終末槽の 2 つに大別すること

ができるが、このホモジネートにはその両方が含まれている。得られたホモジネートを液体窒素で瞬間凍結し、 -80°C の条件下で保存し、SR Ca^{2+} -ATPase 活性および Ca^{2+} 取り込み速度の分析に用いた。

C. 分析項目

1. SR Ca^{2+} -ATPase 活性

SR Ca^{2+} -ATPase 活性値は、Simonide and van Hardeveld¹³⁾の方法に一部修正を加えたものを用いた。実験に使用した反応溶液の組成は、1 mM EGTA, 20 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (Hepes), 200 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 10 mM NaN_3 , 0.4 mM NADH, 10 mM phosphoenolpyruvate, 18 U/ml pyruvate kinase, 18 U/ml lactate dehydrogenase, 0.005% (vol./vol.) Triton X-100, 1.0 mM CaCl_2 (pH 7.5)であった。この溶液に含まれる遊離 Ca^{2+} 濃度は、約 $12\ \mu\text{M}$ であり、この濃度で最大活性が得られることが Simonide and van Hardeveld¹³⁾によって確認されている。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。反応開始直後から、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 $340\ \text{nm}$)。その

後、SR Ca^{2+} -ATPase 活性のみを特異的に抑制するため、 CaCl_2 の濃度を 2 mM (最終濃度) に上げ、上記と同様の方法で NADH の濃度を測定した。初期の NADH の減少率と高濃度 Ca^{2+} を加えた後の減少率の差が、SR Ca^{2+} -ATPase 活性を示すことになる。

2. SR Ca^{2+} 取り込み速度

蛍光 Ca^{2+} 指示薬である indo-1 を用い、 37°C の条件下で Warmington et al.¹⁴⁾の方法に従って測定を行った。実験に使用した反応溶液の組成は、100 mM KCl, 20 mM Hepes, 10 mM NaN_3 , 6.8 mM oxalate, 0.5 mM MgCl_2 , $1\ \mu\text{M}$ indo-1 (pH 7.0)であった。1 ml の反応溶液に PL では $20\ \mu\text{l}$, SOL では $40\ \mu\text{l}$ のホモジネートを加え、 37°C で 2 分間インキュベートした後、0.25 mM CaCl_2 を少量加え、反応溶液中の遊離 Ca^{2+} 濃度が約 $2\ \mu\text{M}$ になるように調節した。反応は MgATP (最終濃度 1 mM) を加えることによって開始した。反応溶液中の $[\text{Ca}^{2+}]_f$ の変化の測定は、細胞内イオン測定装置 (日本分光社製, CAF-110) を用い、 $394\ \text{nm}$ の波長で indo-1 を励起し、 $405\ \text{nm}$ および $500\ \text{nm}$ の蛍光量をモニターすることによって行った (Fig. 1)。 $[\text{Ca}^{2+}]_f$ は、Grynkiewicz et al.¹⁵⁾の報告に従い、

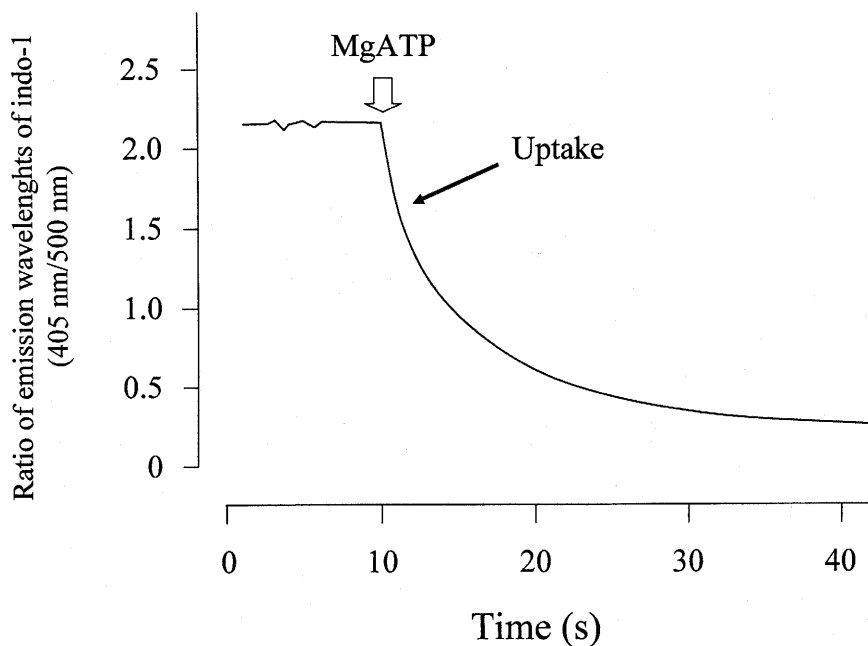


Fig. 1. A typical example of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake rate measurements. Measurements were performed in muscle homogenates using the Ca^{2+} fluorescent dye indo-1. Uptake was initiated by MgATP.

$$[Ca^{2+}]_f = Kd \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F_f / F_b$$

の式に基づいて計算した。ここで, R はサンプルの蛍光比 (405 nm/500 nm), R_{min} は全ての indo-1 が Ca^{2+} と結合していない場合の蛍光比, R_{max} は全ての indo-1 が Ca^{2+} と結合している場合の蛍光比, F_f は全ての indo-1 が Ca^{2+} と結合していない場合の 500 nm 蛍光量, F_b は全ての indo-1 が Ca^{2+} と結合している場合の 500 nm 蛍光量である。また, Kd は解離定数であり, 250 nM を採用した¹⁵⁾。Fig. 1 に, MgATP を添加した後の蛍光比の変化を示した。この反応系では, Ca^{2+} 取り込み速度は反応溶液中の $[Ca^{2+}]_f$ に依存し, 反応が進行し $[Ca^{2+}]_f$ が低下するにつれ, その値が漸減することが知られている¹⁰⁾。本研究ではこの影響を排除するために, 溶液中の $[Ca^{2+}]_f$ が 1000 nM に達した後, 10秒間の濃度変化を測定し Ca^{2+} 取り込み速度とした。

D. 統計分析

統計量は平均値±標準偏差で示した。回復時間の影響および筋による変化の差異を検討するために, 二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 の方法により平均値の差異の有意性を検討した。なお, 有意水準は 5% とした。

Ⅲ. 実験結果

A. SR Ca^{2+} 取り込み速度

Fig. 2 に, SR Ca^{2+} 取り込み速度の変化を示した。PL においては, CON 群に対する E_0 群の値は 73% であり, 両群間の差異は統計的に有意であった。回復期 30 分まで, 取り込み速度は 85% にまで漸増したが, CON 群との差異は依然有意であった。一方, E_{60} 群と CON 群の間には有意差は認められなかった。SOL においても, E_0 群では CON 群の 62% の値を示し, 有意な差異が観察された。しかしながら, E_{15} 群では CON 群との有意差が認められず, E_{30} 群および E_{60} 群においても同様であった。

B. SR Ca^{2+} -ATPase 活性

Fig. 3 に, SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を示した。PL では, Ca^{2+} 取り込み速度と類似した変化がみられた。CON 群に対する値は, E_0 群では 77%, E_{15} 群および E_{30} 群では 85% であり, CON 群との差異は有意であった。これに対して, E_{60} 群の値は CON 群とほぼ同様であった。一方, SOL では PL とは大きく異なる回復過程がみられた。 E_0 群は CON 群と比較して 10% の低値を示したものの, 両群間の違いは有意ではなかった。しかしながら, 回

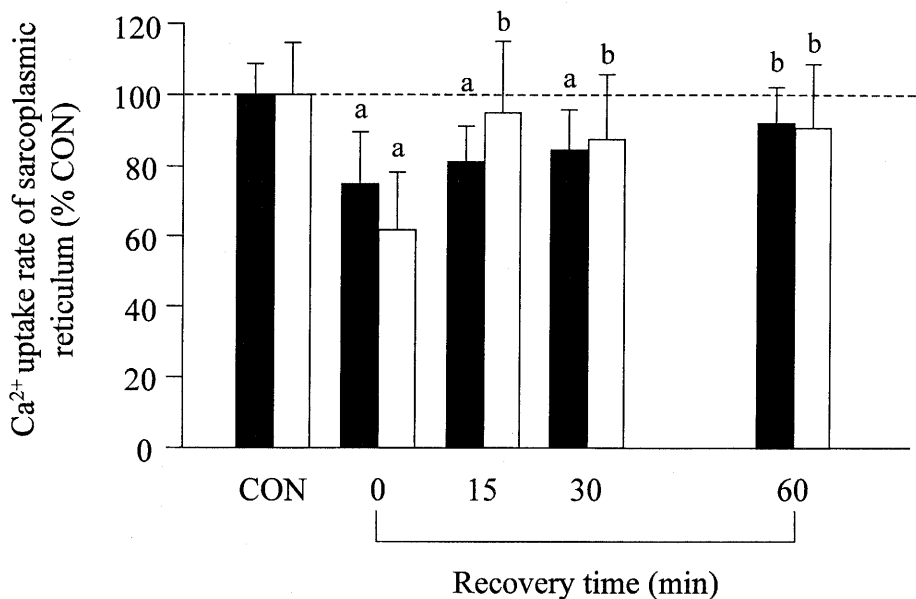


Fig. 2. High-intensity exercise-induced changes in Ca^{2+} uptake rate of sarcoplasmic reticulum in plantaris (■) and soleus (□). The rats were subjected to treadmill runs exhaustion at the intensity estimated to require 100% of maximal O_2 consumption. Values are means ± SD. The results are expressed as percentages of control (CON). ^a $P < 0.05$ vs CON. ^b $P < 0.05$ vs 0 min.

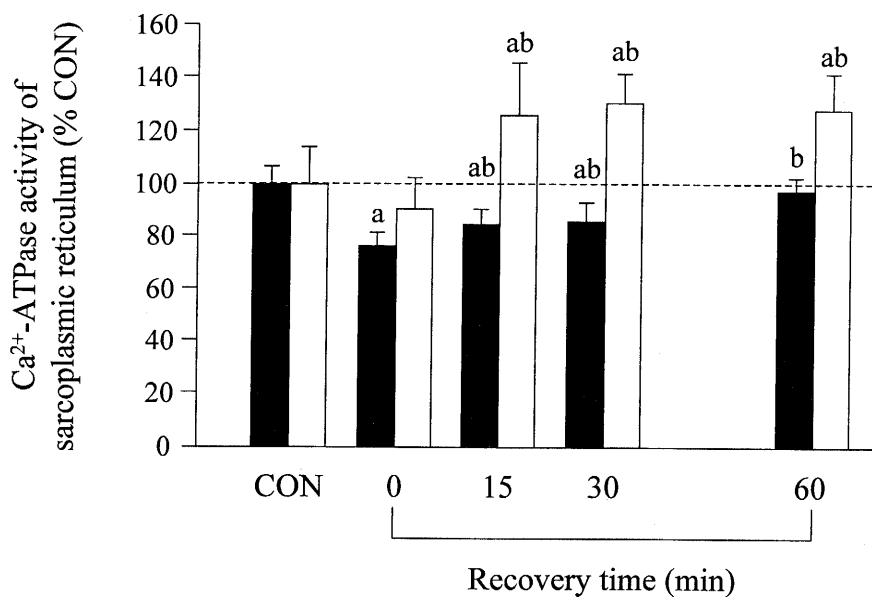


Fig. 3. High-intensity exercise-induced changes in Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum in plantaris (■) and soleus (□). For treatment of rats, see legend to Fig. 2. Values are means \pm SD. The results are expressed as percentages of control (CON). ^a $P < 0.05$ vs CON. ^b $P < 0.05$ vs 0 min.

復期において活性は上昇し、CON 群と比較して E₁₅ 群では25%、E₃₀ 群および E₆₀ 群では30%の有意な高値が観察された。

C. SR Ca^{2+} -ATPase 活性に対する Ca^{2+} 取り込み速度の比

SR Ca^{2+} 取り込み速度は、SR Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} 輸送速度と SR からの Ca^{2+} 漏出速度の

バランスによって決定される。しかしながら、正常な状態では Ca^{2+} 漏出が取り込みに及ぼす影響は小さく、通常、SR Ca^{2+} 取り込み速度は SR Ca^{2+} -ATPase 活性によってほぼ規定されていると考えられている³⁾。これに対して、筋細胞内の環境が大きく変化した際、 Ca^{2+} の漏出が起こることがあり、この現象の有無を検討する場合、SR Ca^{2+} -ATPase 活性に対する SR Ca^{2+} 取り込み速度の比 (uptake :

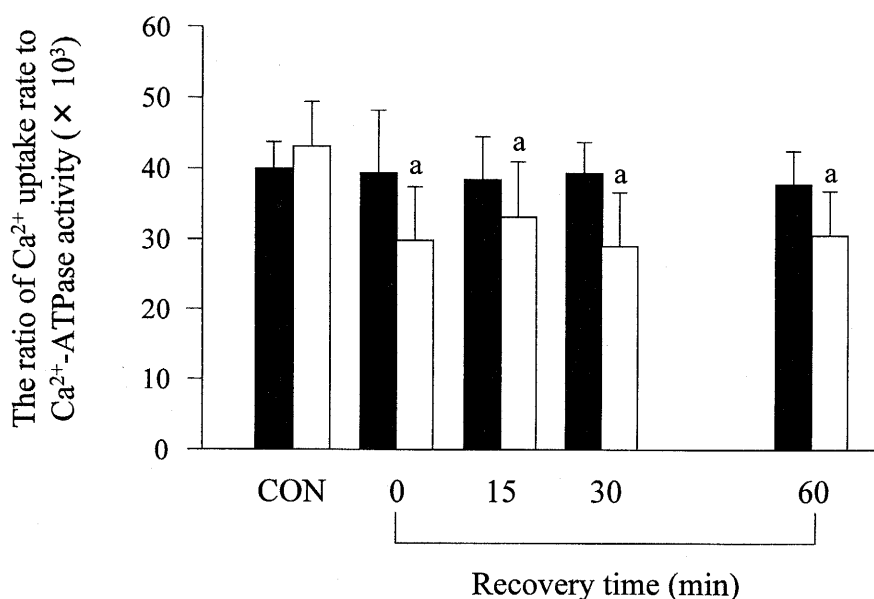


Fig. 4. High intensity exercise-induced changes in the ratio of Ca^{2+} uptake rate to Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum in plantaris (■) and soleus (□). For treatment of rats, see legend to Fig. 2. Values are means \pm SD. ^a $P < 0.05$ vs CON. ^b $P < 0.05$ vs 0 min.

activity ratio)をパラメータとして用いることが多い^{3,10,16,17}). CON群では, PLとSOLとの間に uptake: activity ratio に有意な差は認められなかった(Fig. 4). PLでは運動および回復による変化は認められなかったのに対し, SOLではE群全てにおいてCON群と比較して有意な低値が観察された.

IV. 考 察

高強度運動後の回復期におけるSRのCa²⁺取り込み機能を観察した先行研究では, いずれも回復期の一時期しか観察しておらず⁵), 経時的にどのような回復過程をたどるのかは不明であった. 本研究の結果から, 速筋と比べ遅筋においてCa²⁺取り込み速度は早期に回復すること, および遅筋ではCa²⁺取り込み速度とCa²⁺-ATPase活性は同期して変化するわけではないことが明らかとなった.

本研究の結果は, 高強度運動によって速筋, 遅筋の両方において, SR Ca²⁺取り込み機能が低下することを示す先行研究^{4,18})と一致するものである. SR Ca²⁺取り込み機能を低減させる原因としては, 無機リンや水素イオン濃度などの代謝的因子があげられる¹⁹). 本研究では, SR Ca²⁺取り込み速度は安静時の細胞内環境に近い溶液中で測定された. したがって, 代謝的因子は生体内ではSRの機能に影響を及ぼしているではあるが, 本研究で観察された取り込み速度の低下には関与しているとは考えにくい.

高強度運動後では, SR Ca²⁺-ATPase活性が低下するとともに, この酵素に含まれるカルボニル基の含有量が増加することが, Matsunaga et al.⁴)によって報告されている. カルボニル基は酸化されたアミノ酸に発生する物質であり, その含有量はタンパク酸化の程度を示す指標として用いることができる. したがって, Matsunaga et al.⁴)の報告は, SR Ca²⁺取り込み機能の低下に, SR Ca²⁺-ATPaseの酸化が関与していることを示唆する. SR Ca²⁺-ATPaseには, 酸化に対し感受性の高いペプチドが6カ所存在し, そのうち1ヶ所がATP結合部位にあること²⁰), また, 筋活動によりSR Ca²⁺-ATPase活性が低下した筋では, この酵素のATP結合部位に構造的な変化が生じていること²¹)が認められている. 高強度運動中では, ミトコンドリアの電子伝達系に加え²²), キサンチンオキシダーゼ

の作用により, 活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の1つであるスーパーオキシドが生成されることが明らかになっており²³), これらの知見からは, ROSによってSR Ca²⁺-ATPaseのATP結合部位が酸化的修飾を受けることが, SR Ca²⁺取り込み機能が低下する成因の1つであると考えられる. Favero et al.²⁴)はin vitroの実験から, ROSによって低下したSR Ca²⁺-ATPase活性は, 還元型グルタチオンにより回復することを示している. 筋に含まれる還元型グルタチオンの濃度は, 速筋と比べ遅筋の方が数倍高く²⁵), 運動後SOLにおいてSR Ca²⁺取り込み速度が早期に回復したのは(Fig. 2), グルタチオンに代表される抗酸化物質の働きにより, 酸化的修飾を受けた部位がより早く復元したためである可能性がある.

興味深い結果は, 回復期において, SOLのSR Ca²⁺-ATPase活性が過回復したことである(Fig. 3). 遅筋線維のSR Ca²⁺-ATPaseにおいてのみ存在するホスホランバンは²⁶), 通常, SR Ca²⁺-ATPaseと結合し, 酵素のCa²⁺に対する親和性を抑制している²⁷). しかしながら, プロテインキナーゼの作用によりこのタンパクがリン酸化されると, 抑制作用が消失し活性が増加することが知られている²⁸). 高強度運動後のラットのSOLにおいて, SR Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺に対する親和性が上昇することが報告されており¹⁸), 高強度運動を行うと, ホスホランバンを介した働きによって, SR Ca²⁺-ATPase活性が亢進されるような条件が形成されると思われる. しかしながら, 運動直後のSOLにおいてSR Ca²⁺-ATPase活性が低下するのは, 活性亢進因子と比べ低減因子の影響の方が強く作用していることに, また, 回復過程において活性が過回復するのは, 低減因子の影響が亢進因子に比べ早期に減少することに素因があると推察される.

Fig. 2およびFig. 3に示されるように, SOLでは回復過程において, SR Ca²⁺取り込み速度とSR Ca²⁺-ATPase活性とは同期して変化しなかった. このため, uptake:activity ratioは低下する結果となり(Fig. 4), これはSRから漏出するCa²⁺が増加したことを示すものと考えられる²⁹). 高強度運動によって, Ca²⁺に対するSRの脂質膜の透過性が変化することを示す報告はこれまでなされていない. また, ADPや無機リンの濃度が高まると, SR

Ca^{2+} -ATPase が通常とは逆方向に作動し、 Ca^{2+} が漏出することが報告されているが³⁰⁾、少なくとも本研究で用いた実験条件下ではそのような現象が起こると思われない。考えられる要因としては、運動による筋温の上昇があげられる。SR を41°Cで30分間 incubation すると、SR Ca^{2+} 取り込み速度の低下が起こるが、 Ca^{2+} 放出チャネルを薬理的にブロックすると、この低下が抑制されることが認められており²⁹⁾、この知見は SR が通常の体温を超える温度に曝露されると、 Ca^{2+} 放出チャネルから Ca^{2+} が漏出するようになることを示唆する。このようなメカニズムを介して、 Ca^{2+} の漏出が起こった可能性が推測されるが、このような現象が生体内で本当に生じているのか、また生じているとすれば、それがなぜ遅筋である SOL のみでみられるのかについてはよく分らない。

安静時筋形質 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇すると、タンパク分解の促進¹⁾や興奮収縮連関におけるシグナル伝達不全^{9,31)}が誘起されることは広く認められている事実である。SOL は抗重力筋として立位姿勢を保持するうえで重要な役割を果たしており、「立つ、歩く」などの日常的な動作を行うのに不可欠な筋である。運動後、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が上昇し、 Ca^{2+} 取り込み機能をいち早く回復するようなメカニズムは、この筋の機能や形態の変化を抑制するように、哺乳類が進化した結果なのかもしれない。

カルシニューリンは、 Ca^{2+} 依存性プロテインホスファターゼの一種であり、 Ca^{2+} によってその働きが活性化されることが知られている。カルシニューリンの抑制剤であるサイクロスポリン A の投与が、筋線維の fast から slow への移行を妨げるとする知見は³²⁾、カルシニューリンが筋の slow 方向への変換に関与していることを示す。速筋 (type II) 線維のサブグループである type IIA 線維と type IIB 線維を比較すると、前者の方が化学的エネルギーを機械的エネルギーに変換する効率が高く³³⁾、トレーニングによって生ずる type IIB 線維から type IIA 線維へのタイプ移行は、筋全体のエネルギー効率を高めようとする適応変化であると考えられる。速筋において、運動後 SR Ca^{2+} 取り込み機能の低下が、相対的に長時間継続するのは、カルシニューリンの作用を亢進するのに必然である可能性がある。

以上のことから、速筋と比べ遅筋において SR

Ca^{2+} 取り込み速度は早期に回復すること、および遅筋では SR Ca^{2+} 取り込み速度と SR Ca^{2+} -ATPase 活性は同期して変化するわけではないことが明らかとなった。遅筋でみられた早急な Ca^{2+} 取り込み機能の回復は、継続した収縮活動が負荷される遅筋において、機能や形態が変化するのを抑制するよう作用しているものと推察される。

V. 総 括

本研究では、高強度運動後の回復期における筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) の Ca^{2+} 取り込み機能の変化を、Wistar 系雄性ラットを用いて検討した。速度 50 m/min、上り勾配10%で疲労困憊に至るまで走行させ、走行直後および走行終了15分後、30分後、1時間後に、速筋である足底筋 (plantaris, PL) および遅筋であるヒラメ筋 (soleus, SOL) を採取し、ホモジネートから生化学的分析を行い、以下の結果を得た。

1. SR Ca^{2+} 取り込み速度は、PL, SOL とも運動直後に安静時と比較して有意な低下が認められた。PL では走行終了30分後においても取り込み速度は回復しなかったのに対して、SOL では15分後に回復することが認められた。
2. SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、PL では Ca^{2+} 取り込み速度と同様の変化を示した。一方、SOL では回復期において25~30%過回復することが観察された。
3. SR Ca^{2+} -ATPase 活性に対する Ca^{2+} 取り込み速度の比は、PL では運動直後および回復期に変化は認められなかった。これに対して、SOL では運動直後および回復期において低下することが認められた。

以上のことから、高強度運動後の回復期では、速筋より遅筋において SR の Ca^{2+} 取り込み機能が早期に回復することが明らかになった。遅筋でみられた早急な Ca^{2+} 取り込み機能の回復は、継続した収縮活動が負荷される遅筋において、機能や形態が変化するのを抑制するよう作用しているものと推察される。

(受理日 平成18年8月17日)

文 献

- 1) Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D. & Raj, D. A.

- Exercised-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell Biochem.*, (1998), **179**, 135-145.
- 2) Tupling, A. R. The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: role of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Can. J. Appl. Physiol.*, (2004), **29**, 308-329.
 - 3) Inashima, S., Matsunaga, S., Yasuda, T. & Wada, M. Effect of endurance training and acute exercise on sarcoplasmic reticulum function in rat fast- and slow-twitch muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.*, (2003), **89**, 142-149.
 - 4) Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T. & Wada, M. Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflugers Arch.*, (2003), **446**, 394-399.
 - 5) Hill, C. A., Thompson, M. W., Ruell, P. A., Thom, J. M. & White, M. J. Sarcoplasmic reticulum function and muscle contractile character following exercise in humans. *J. Physiol. (Lond.)*, (2001), **531**, 871-878.
 - 6) Li, J. L., Wang, X. N., Fraser, S. F., Carey, M. F., Wrigley, T. V. & McKenna, M. J. Effects of fatigue and training on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, (2002), **92**, 912-922.
 - 7) Carroll, S., Nicotera, P. & Pette, D. Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am. J. Physiol.*, (1999), **277**, C1122-C1129.
 - 8) Helander, I., Westerblad, H. & Katz, A. Effects of glucose on contractile function, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and glycogen in isolated mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, (2002), **282**, C1306-C1312.
 - 9) Verburg, E., Dutka, T. L. & Lamb, G. D. Long-lasting muscle fatigue: partial disruption of excitation-contraction coupling by the elevated cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ during contractions. *Am. J. Physiol.*, (2006), **290**, C1199-C1208.
 - 10) Schertzer, J. D., Green, H. J., Fowles, J. R., Duhamel, T. A. & Tupling, A. R. Effects of prolonged exercise and recovery on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling properties in rat muscle homogenates. *Acta Physiol. Scand.*, (2004), **180**, 195-208.
 - 11) Gollnick, P. D., Korge, P., Karpakka, J. & 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.
 - 12) Brooke, G. A. & White, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.*, (1978), **45**, 1009-1015.
 - 13) Simonides, W. S. & van Hardeveld, C. An assay for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in muscle homogenate. *Anal. Biochem.*, (1990), **191**, 321-331.
 - 14) Warmington, S. A., Hargreaves, M. & Williams, D. A. A method for measuring sarcoplasmic reticulum calcium uptake in skeletal muscle using Fura-2. *Cell Calcium*, (1996), **20**, 73-82.
 - 15) Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.*, (1985), **260**, 3440-3450.
 - 16) Duhamel, T. A., Green, H. J., Perco, J. G., Sandiford, S. D. & Ouyang, J. Human muscle sarcoplasmic reticulum function during submaximal exercise in normoxia and hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, (2004), **97**, 180-187.
 - 17) Holloway, G. P., Green, H. J., Duhamel, T. A., Ferth, S., Moule, J. W., Ouyang, J. & Tupling, A. R. Muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling adaptation during 16 h of heavy intermittent cycle exercise. *J. Appl. Physiol.*, (2005), **99**, 836-843.
 - 18) Yasuda, T., Inashima, S., Sasaki, S., Kikuchi, K., Niihata, S., Wada, M. & Katsuta, S. Effects of exhaustive exercise on biochemical characteristics of sarcoplasmic reticulum from rat soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.*, (1999), **165**, 45-50.
 - 19) Stienen, G. J., Papp, Z. & Zaremba, R. Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned fibres of *Xenopus laevis*. *J. Physiol. (Lond.)*, (1999), **518**, 735-744.
 - 20) Viner, R. I., Krainev, A. G., Williams, T. D., Schoneich, C. & Bigelow, D. J. Identification of oxidation-sensitive peptides within the cytoplasmic domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Biochemistry*, (1997), **36**, 7706-7716.
 - 21) Luckin, K. A., Favero, T. G. & Klug, G. A. Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca^{2+} -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.*, (1991), **46**, 391-405.
 - 22) Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, (2002), **80**, 780-787.
 - 23) Granger, D. N., McCord, G. M., Parks, D. A. & Hollwarth, M. E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*, (1986), **90**, 80-84.
 - 24) Favero, T. G., Colter, D., Hooper, P. F. & Abramson, J. J. Hypochlorous acid inhibits Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.*, (1998), **84**, 425-430.
 - 25) Ji, L. L., Fu, R. G. & Mitchell, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.*, (1992), **73**, 1854-1859.
 - 26) Ferrington, D. A., Yao, Q., Squier, T. C. & Bigelow, D. J. Comparable levels of Ca -ATPase inhibition by phospholamban in slow-twitch skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, (2002), **41**, 13289-13296.
 - 27) James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M. & Carafoli, E.

- Nature and site of phospholamban regulation of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, (1989), **342**, 90-92.
- 28) LePeuch, C. J. & Demaille, J. G. Covalent regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium*, (1989), **10**, 397-400.
- 29) Schertzer, J. D., Green, H. J. & Tupling, A. R. Thermal instability of rat muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function. *Am. J. Physiol.*, (2002), **283**, E722-E728.
- 30) Duke, A. M. & Steele, D. S. Characteristics of phosphate-induced Ca^{2+} efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.*, (2000), **278**, C126-C135.
- 31) Lamb, G. D., Junankar, P. R. & Stephenson, D. G. Raised intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J. Physiol. (Lond.)*, (1995), **489**, 349-362.
- 32) Dunn, S. E., Burns, J. L. & Michel, R. N. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, (1999), **274**, 21908-21912.
- 33) Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C. & Stienen, G. J. M. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*, (1994), **481**, 663-675.