

高強度トレーニングおよび一過性の運動が筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み機能に及ぼす影響 —酸化修飾との関連—

松 永 智¹⁾ 三 島 隆 章²⁾
山 田 崇 史³⁾ 和 田 正 信⁴⁾

EFFECT OF HIGH-INTENSITY TRAINING AND ACUTE EXERCISE ON Ca^{2+} -SEQUESTERING FUNCTION OF SARCOPLASMIC RETICULUM : ROLE OF OXIDATIVE MODIFICATION

SATOSHI MATSUNAGA, TAKAAKI MISHIMA,
TAKASHI YAMADA and MASANOBU WADA

Abstract

To investigate the influences of high-intensity training and/or a single bout of exercise on *in vitro* Ca^{2+} -sequestering function of the sarcoplasmic reticulum (SR), the rats were subjected to 8 weeks of an interval running program (final training : 2.5-min running \times 4 sets per day, 50 m/min at 10% incline). Following training, both trained and untrained rats were run at a 10% incline, 50 m/min for 2.5 min or to exhaustion. SR Ca^{2+} -ATPase activity, SR Ca^{2+} -uptake rate and carbonyl group contents comprised in SR Ca^{2+} -ATPase activity were examined in the superficial portions of the gastrocnemius and vastus lateralis muscles. For rested muscles, a 12.7% elevation in the SR Ca^{2+} -uptake rate was induced by training. Training led to improved running performance (avg time to exhaustion : untrained-191.1 vs trained-270.9 sec ; $P < 0.01$). Regardless of training status, a single bout of exercise caused progressive reductions in SR Ca^{2+} -ATPase activity and SR Ca^{2+} -uptake rate. Increases in carbonyl content only occurred after exhaustive exercise ($P < 0.05$). At both point of 2.5-min and exhaustion, no differences existed in SR Ca^{2+} -sequestering capacity and carbonyl content between untrained and trained muscles. These findings confirm the previous findings that oxidative modifications may account, at least partly, for exercise-induced deterioration in SR Ca^{2+} -sequestering function ; and raise the possibility that in the final phase of acute exercise, high-intensity training could delay the progression of protein oxidation of SR Ca^{2+} -ATPase.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2008, 57 : 327~338)

key word : muscle fatigue, reactive oxygen species, Ca^{2+} -uptake, adaptation

I. 緒 言

筋が発揮する張力は、筋形質内の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_f$) によって制御されている。骨格筋では、袋状膜構造をなす筋小胞体(sarcoplasmic reticulum ;

SR) がこの $[\text{Ca}^{2+}]_f$ を主として調節しており、SR 内腔から筋形質へと Ca^{2+} が放出されると収縮が、一方筋形質から SR 内腔へと Ca^{2+} が取り込まれると弛緩が起る。分子量 110-kDa の SR Ca^{2+} -ATPase は、SR の縦走管上に点在するタンパク質

¹⁾ 大阪市立大学 都市健康・スポーツ研究センター
〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

²⁾ 八戸短期大学幼児保育学科
〒031-8566 青森県八戸市美保野13-98

³⁾ Department of Physiology and Pharmacology,
Karolinska Institutet
Huddinge SE-171 77, Stockholm, Sweden

⁴⁾ 広島大学大学院 総合科学研究科
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1

Research Center for Urban Health and Sports, Osaka City
University, 3-3-138 Sumiyoshi, Sugimoto, Osaka 558-8585, Japan

Pre School Education Department, Hachinohe Junior College, 13-384
Mihono, Hachinohe, Aomori, Japan, 031-0844

Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet,
Huddinge SE-171 77, Stockholm, Sweden

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima
University, 1-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima,
Japan, 739-8521

であり, Ca^{2+} の取り込みはこの酵素の作用によって能動的に行なわれる。

収縮を繰り返し負荷すると, 筋の発揮する張力あるいはパワーはやがては低下し, この現象は一般に「筋疲労」と呼ばれる。筋疲労が起こるメカニズムについては, 長年にわたって研究がなされてきたが, 現在もなお明確ではない部分が少なくはない。1980年代に Ca^{2+} 蛍光指示薬開発され¹⁾, 比較的容易に, また少量の筋サンプルから, SR の機能を測定できるようになり, 筋活動が SR に及ぼす影響について数多くの報告がなされるようになった。これらの研究の多くにおいて, 疲労困憊に至る運動後では, SR の Ca^{2+} 放出・取り込み機能が低下することが示され²⁻⁶⁾, 現在では, この変化が筋疲労を招来する主要な原因の1つであると考えられている。

in vitro の条件下で, 精製した SR Ca^{2+} -ATPase を活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)に曝露すると, その活性が低下することから, 激しい筋活動によって, 生体内で SR の Ca^{2+} 取り込み機能が低下するのは, 収縮に伴って発生する ROS に成因があることが指摘されている⁷⁾。実際, 数日間にわたり継続的に筋収縮を負荷すると, SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下するとともに酵素が酸化的修飾を受けることが, 電気刺激を用いた Klebl et al.⁸⁾ の研究によって示されている。しかしながら, このような方法により誘引された細胞内環境は, 必ずしも生理的な条件であるとはいえず, 通常行なう運動においても, SR Ca^{2+} -ATPase の酸化が起こるか否かについては, 彼らの示す知見から結論することはできない。この点について我々は, ランニングを行なわせたラットの主働筋について検討し, Klebl et al.⁸⁾ の報告と同様の現象(SR Ca^{2+} -ATPase の酸化)が生ずることを認めている⁶⁾。

持久トレーニングを行なうと, 酸化的リン酸化に関与する酵素の活性が著しく増加することなどに示されるように⁹⁾, 骨格筋は高い可塑性を有していることに特徴がある。筋に起こる適応変化は行なうトレーニングのタイプによって異なる場合が多く, 例えば, スプリントトレーニングで生ずる解糖系酵素活性の増加は, 持久性トレーニングでは観察されない⁹⁾。トレーニングのタイプに依存して生ずるこのような特異的な変化は, いずれも行なったトレーニング様式での運動パフォーマンスを改善することに

つながる。

我々は最大酸素摂取量($\dot{V}\text{O}_2\text{max}$)の100%に相当する強度でのランニングトレーニングを数週間ラットに負荷すると, その強度での走行パフォーマンスが改善されることを観察している²⁾。先に述べた SR の機能低下のメカニズムに関する知見を考慮すると, この改善が 1) トレーニングによって, 一過性の運動中生ずる SR Ca^{2+} -ATPase の酸化の程度が軽減され, 2) そのため, SR Ca^{2+} -ATPase 活性が一定の値にまで低下する時間が遅延することに成因がある可能性がある。しかしながら, 運動が SR の酸化状態に及ぼす影響に関するこれまでの先行研究は, トレーニングを負荷していない個体を対象に疲労困憊時の様相を検討したものであり, 報告された知見から, 前述の2つの可能性について言及することはできない。そこで本研究では, 100% $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ に相当する強度のトレーニングと一過性の運動が, SR の Ca^{2+} 取り込み機能および SR Ca^{2+} -ATPase タンパク質の酸化状態に及ぼす影響を, 疲労困憊時に加え疲労困憊前の時点についても検討することを目的とした。

II. 実験方法

A. 実験動物および実験プロトコール

実験には, Wistar 系雄性ラット42匹を用いた。水と飼料(日本クレア CE-2)は自由摂取とし, 12時間の明暗サイクルの照明下で温度22~24℃に常時維持した飼育室においてラットを飼育した。4週齢から飼育を始め, 1週間の予備飼育後, トレーニング群(Tr 群: n=21)と非トレーニング群(unTr 群: n=21)とにランダムに分け, Tr 群には8週間のランニングトレーニングを小動物用トレッドミル(夏目製作所 KN-73)を用いて行なわせた。運動強度を走行速度 50 m/min, 上り勾配10%とし, トレーニング開始3週間までは, 1日の走行時間を漸増した。この運動強度は, ラットの最大酸素摂取量の100%に相当することが報告されている¹⁰⁾。1回の走行時間は2.5分を最大とし, これに達した場合は, 休憩を挟み残りの時間走行させた。4~8週間は, 1回2.5分のランニングを3分間の休憩を挟み1日4セット行なわせた。なお, トレーニングの頻度は週5日であった。Tr 群にトレーニングを行わせた期間, トレッドミルでの走行運動に慣れさせるため

に, unTr 群の全てのラットにトレッドミルランニングを週2日の頻度で課した(1週目: 30 m/min, 1分間, 2週目: 30 m/min, 2分間, 3週目: 30 m/min, 3分間, 4~6週目: 40 m/min, 1分間, 7~8週目: 40 m/min, 0.5分間と 50 m/min, 0.5分間).

トレーニング終了後, Tr 群および unTr 群を, 安静群(Tr-R 群, unTr-R 群; それぞれ n=7), 2.5分運動群(Tr-2.5群, unTr-2.5群; それぞれ n=7) および疲労困憊群(Tr-E 群, unTr-E 群; それぞれ n=7)にランダムに分けた. 最終トレーニング終了後約48時間後に, 速度 50 m/min, 上り勾配10%でのトレッドミルランニングを, 2.5分運動群には2.5分間, 疲労困憊群には疲労困憊に至るまで行わせた. なお, 本実験における実験の手順および方法は, 広島大学動物実験委員会からの承諾が得られたものである.

B. 筋ホモジネート

ランニング終了後でき得る限り迅速に, 麻酔下で外側広筋表層部および腓腹筋表層部を両脚から摘出し, 混合して被験筋とした. 本研究で用いたものと同様のランニング運動によって, 両筋においてSRの機能が低下することが報告されており⁶⁾, この知見に基づきこれらの筋を被験筋に選定した. また, 2つの筋を混合して用いたのは, ミクロソームを精製する過程で, 多量の筋(約 1 g)を必要とするためである. 冷却した抽出液(40 mM Tris, 300 mM sucrose, 20 mM Mops/KOH, 0.014 mM pepstatin A, 0.83 mM benzamide, 0.0022 mM leupeptin, 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, pH 7.4)で筋をよく洗浄した後, ガラスホモジナイザーを用いて, 9倍量(mass vol⁻¹)の抽出液でホモジナイズした. 得られた試料を 2,000 g で20分間遠心分離した後, 上清を液体窒素中で瞬間凍結し, 分析まで-80℃で保存した. この試料から, SR Ca²⁺-ATPase 活性および Ca²⁺ 取り込み速度を測定した.

C. SR Ca²⁺-ATPase 活性, Ca²⁺ 取り込み速度

Simonides & van Hardeveld¹¹⁾の示す方法を一部修正したものを用い, SR Ca²⁺-ATPase 活性を37℃の条件下で測定した. 修正点は, 測定中 NADH が枯渇することを防止するために, 反応溶液中の

NADH の濃度を 0.2 mM から 0.4 mM に高めたことである. 反応溶液の組成は, 1 mM EGTA, 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N''-2-ethanesulfonic acid(HEPES), 200 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, 0.4 mM NADH, 10 mM phosphoenolpyruvate, 0.8 mM CaCl₂, 18 U mL⁻¹ pyruvate kinase, 18 U mL⁻¹ lactate dehydrogenase, 4 μg mL⁻¹ Ca²⁺ ionophore A23187(pH 7.1)であった. 1.98 mL の反応溶液に 20 μL の筋ホモジネートを加え, 37℃で3分間インキュベートした. その後, ATP(最終濃度 5 mM)を加え反応を開始し, NADH の濃度変化を分光光度計にて測定した(波長 340 nm). 次に, SR Ca²⁺-ATPase 活性を特異的に抑制するために, CaCl₂ の濃度を 2 mMに増加し, 同様に NADH の濃度変化を測定し, 2つの測定値の差から SR Ca²⁺-ATPase 活性を算出した.

Ward et al.¹²⁾の方法に従い, SR Ca²⁺ 取り込み速度を37℃の条件下で測定した. 反応溶液の組成は, 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 7.5 mM potassium oxalate, 1 μM Indo-1, 0.5 mM MgCl₂(pH 7.0)であった. 1 mLの反応溶液に 20 μL の筋ホモジネートを加え, ATP(最終濃度 5 mM)を加えることにより反応を開始した. 細胞内イオン測定装置を用い, 349 nm の波長で Ca²⁺ 蛍光指示薬である Indo-1 を励起し, 405 nm および 500 nm の蛍光量をモニターすることにより, 反応溶液中の [Ca²⁺]_f を測定した. Grynkiewicz et al.¹⁾が示す式から, [Ca²⁺]_f を算出した.

D. ミオシン重鎖

ミオシン重鎖(myosin heavy chain; MHC)を検出するために, 8倍量(mass vol⁻¹)の抽出液(100 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 300 mM KCl, 5 mM ATP, pH 8.6)で筋をホモジナイズした. 得られたホモジネートを 10,000 g で10分間遠心分離した後, 上清を採取し上清と同量(vol vol⁻¹)の glycerol で混合し, サンプルとして用いた. ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)により, 0.3 μg の筋タンパク質を分画した後(通電-160 V, 24時間)¹³⁾, Oakley et al.¹⁴⁾の方法によりゲルに銀染色を施し, National Institute of Health-image (NIH-image) soft-

ware により MHC アイソフォームの分布比率を解析した. なお, SDS-PAGE に用いたセパレーティングゲルの組成は, 6.8% (mass vol⁻¹) polyacrylamide, 0.18% (mass vol⁻¹) bisacrylamide, 200 mM Tris, 100 mM glycine, 30% (vol vol⁻¹) glycerol, 0.4% (mass vol⁻¹) SDS, 0.1% (vol vol⁻¹) TEMED, 0.05% (mass vol⁻¹) ammonium persulfate (pH 8.6) であった.

E. SR Ca²⁺-ATPase 1a 含有量

SR Ca²⁺-ATPase のタンパク質量および SR Ca²⁺-ATPase に含まれるカルボニル基の量を測定するために, 約 1 g の筋から Nakamura et al.¹⁵⁾ の方法に従ってミクロソームを精製した. SR Ca²⁺-ATPase タンパク質量の測定には 2 種類の手法を用いた. 1 つは, SDS-PAGE とクーマシーブリリアントブルー染色により SR Ca²⁺-ATPase の全タンパク量を, 他の 1 つはウェスタンブロットにより, fast type のアイソフォームである SR Ca²⁺-ATPase 1a の量を測定する方法であった. 全タンパク量測定には 20 μg, SR Ca²⁺-ATPase 1a 測定には 10 μg のタンパク質を含むミクロソームを用いた. 外側広筋および腓腹筋表層部には SR Ca²⁺-ATPase 2a は存在しないことが示されており⁶⁾, 本研究ではタンパク量測定には SR Ca²⁺-ATPase 1a に対する抗体のみを用いた. また, サンプルと同時に分子量マーカーを泳動することにより, 110-kDa の SR Ca²⁺-ATPase を同定した⁸⁾.

まず, SDS-PAGE により, ミクロソームに含まれるタンパク質を分画した. この SDS-PAGE で用いたセパレーティングゲルの組成は, 10% (mass vol⁻¹) polyacrylamide, 0.1% (mass vol⁻¹) bisacrylamide, 200 mM Tris, 100 mM glycine, 5% (vol vol⁻¹) glycerol, 0.4% (mass vol⁻¹) SDS, 0.1% (vol vol⁻¹) TEMED, 0.1% (mass vol⁻¹) ammonium persulfate (pH 8.6) であった. その後, 全タンパク質測定用のゲルには, 0.25% クーマシーブリリアントブルー R を用い染色を施した. また, SR Ca²⁺-ATPase 1a 測定用のゲルに含まれるタンパク質は, polyvinylidene difluoride 膜 (Atto, Tokyo, Japan) に転写した. 5% (mass vol⁻¹) skim milk, 8.1 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% (vol vol⁻¹) Tween 20, 0.02% (mass vol⁻¹)

NaN₃ (pH 7.4) から構成される溶液でブロッキング後, 2,500 倍 (vol vol⁻¹) に希釈した 1 次抗体 (anti-SR Ca²⁺-ATPase 1a 抗体; Affinity Bioreagents, USA) および 1,000 倍 (vol vol⁻¹) に希釈した 2 次抗体 (rabbit anti-mouse IgG; Dako, Glostrup, Denmark) と反応させた. 両抗体の希釈液の組成は, 8.1 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% (vol vol⁻¹) Tween 20, 0.02% (mass vol⁻¹) NaN₃ (pH 7.4) であった⁶⁾. 化学発光検出試薬 (ECL plus Western blotting detection reagents, Amersham, England) を用いて 2 次抗体を発光させ¹⁶⁾, 発生した光を X 線フィルムに感光した. タンパク量は, NIH-image を用いて定量した⁸⁾.

F. SR Ca²⁺-ATPase に含まれるカルボニル含有量

ミクロソームを用い, SR Ca²⁺-ATPase に含まれるカルボニル基 (ATPase カルボニル) の量を測定した. タンパク質に含まれる 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 反応性カルボニル量は, そのタンパク質が受けた酸化的修飾の程度の指標となることが示されており⁸⁾, 本研究でもこの方法を採用した. 各サンプルに対し 2 本のマイクロチューブを用い, 1 本を DNPH 測定用, 1 本は対照用とした. 測定用には 6% (mass vol⁻¹) SDS, 5% (vol vol⁻¹) trifluoroacetic acid, 10 mM DNPH からなる溶液を, 対照用には 6% (mass vol⁻¹) SDS をサンプルの 2 倍量 (vol vol⁻¹) 加え, 室温で 10 分間反応させた. その後, 2 M Tris, 30% (vol vol⁻¹) glycerol, 19% (vol vol⁻¹) 2-mercaptoethanol, 0.02% (mass vol⁻¹) bromophenol blue をサンプルの 1.5 倍量 (vol vol⁻¹) 加え, 反応を終了させた¹⁷⁾. 1 サンプルあたり 5 μg のタンパク質を, SR Ca²⁺-ATPase 量の測定に用いたものと同様の SDS-PAGE で分画した. 分画したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し, 引き続き 3% (mass vol⁻¹) bovine serum albumin, 0.1% (vol vol⁻¹) Tween 20, 58 mM NaHPO₄, 17 mM NaH₂PO₄, 68 mM NaCl (pH 7.0) からなる溶液でブロッキングした. その後, タンパク質に含まれる DNPH と 10,000 倍 (vol vol⁻¹) に希釈した anti-dinitro-phenyl 抗体 (Sigma, USA) とを反応させた (希釈溶液にはでブロッキング溶液を使用). 化学発光検出試薬 (CSPD, Roche Diagnostics, USA) を用いて抗体を発光させ,

発生した光をX線フィルムに感光した。NIH-imageを用いバンドの濃度を定量し、測定サンプルとの対照サンプルの差からATPaseカルボニル量を算出した。予備実験においてこの手法で得られるデータの妥当性について検討し、SDS-PAGEに供するタンパク質量とATPaseカルボニル量の間、タンパク質量2.5~20 μg 間では高い正の相関関係があることを観察している($r=0.997$, $P<0.01$)。なお、ホモジネートおよびマイクロソームに含まれるタンパク質の濃度は、Bradford¹⁸⁾の方法に従って測定した。

G. 統計処理

統計量は、平均値±標準誤差で表記した。二元配置の分散分析を用い、運動時間とトレーニングの影響を検討した。分散分析において有意性が認められた場合は、Fisher's PLSDをpost hoc testを用い、群間の平均値の違いを危険率5%未満で判定した。

Ⅲ. 実験結果

A. 走行時間およびミオシン重鎖アイソフォーム分布

疲労困憊群(Tr-E群およびunTr-E群)における

平均走行時間は、Tr-E群で 270.9 ± 26.9 秒、unTr-E群で 191.1 ± 14.1 秒であり、両群間の差異は統計的に有意であった($P<0.01$)。成熟したラットの骨格筋には、4種類のMHCアイソフォームが存在することが知られており¹³⁾、外側広筋と腓腹筋の表層部には、これらのうちのMHCII d/xとMHCII bの2種類のアイソフォームが含まれていた。Fig. 1に示されるように、トレーニングあるいは一過性の運動に起因するそれらの分布比率の変化は認められなかった。

B. SR Ca^{2+} -ATPase 活性および Ca^{2+} 取り込み速度

Tr群とunTr群の両方において、一過性の運動によりSR Ca^{2+} -ATPase活性に有意な減少が認められ($P<0.05$; Fig. 2), それぞれの安静群(Tr-R群およびunTr-R群)に対する疲労困憊群の値は、Tr-E群で72.5%, unTr-E群で68.2%であった。また、2.5分運動群(Tr-2.5群およびunTr-2.5群)の値は、Tr群、unTr群ともに、安静群と疲労困憊群の間であった。Tr群とunTr群間での比較では、安静群および2.5分運動群だけでなく、走行時間が異なった疲労困憊群にも有意な差異は認められな

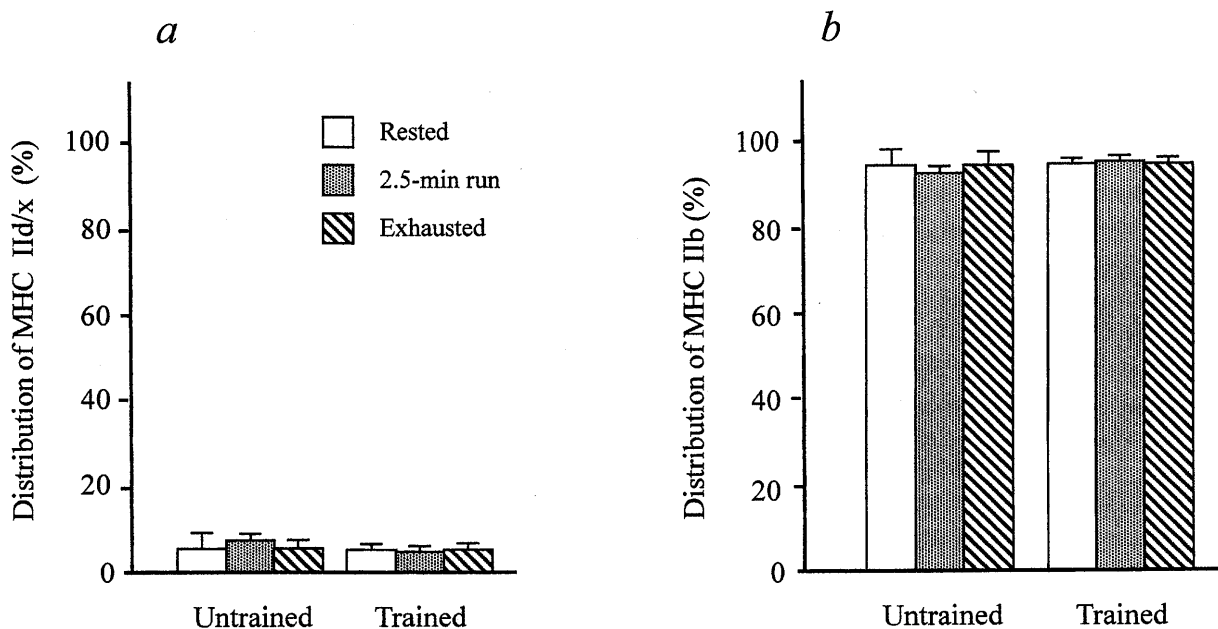


Fig. 1. Relative distribution of myosin heavy chain (MHC) II d/x (a) and II b (b) isoforms. After 8 weeks of high-intensity training, both untrained and trained rats were assigned into rested, 2.5-min run or exhausted groups. The rats of 2.5-min run and exhausted groups were subjected to a single bout of treadmill running (50 m min^{-1} , 10% incline) for 2.5 min and to exhaustion, respectively. Values are means \pm SE ($n=7$).

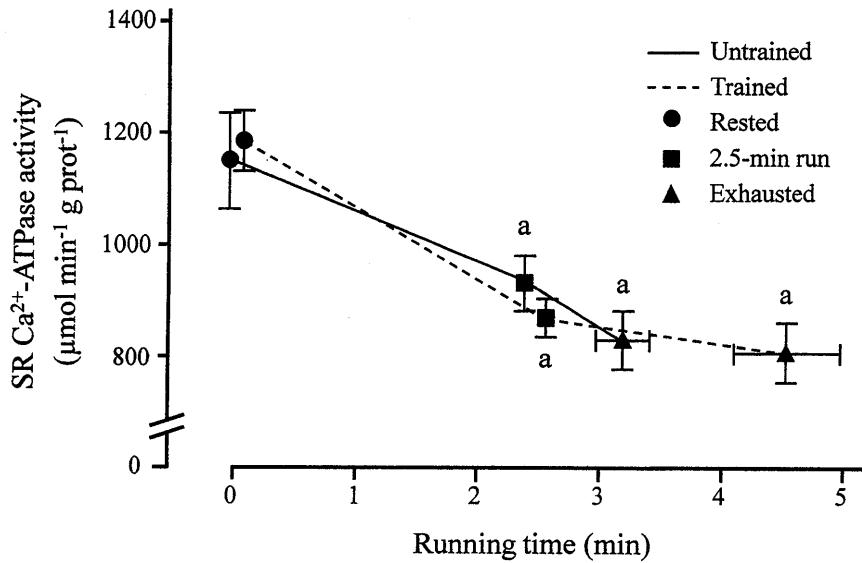


Fig. 2. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-ATPase activity during exercise. For treatment of animals, see legend to Fig. 1. Values are means \pm SE (n=7). ^aP<0.05, vs rested muscles from respective (untrained or trained) groups.

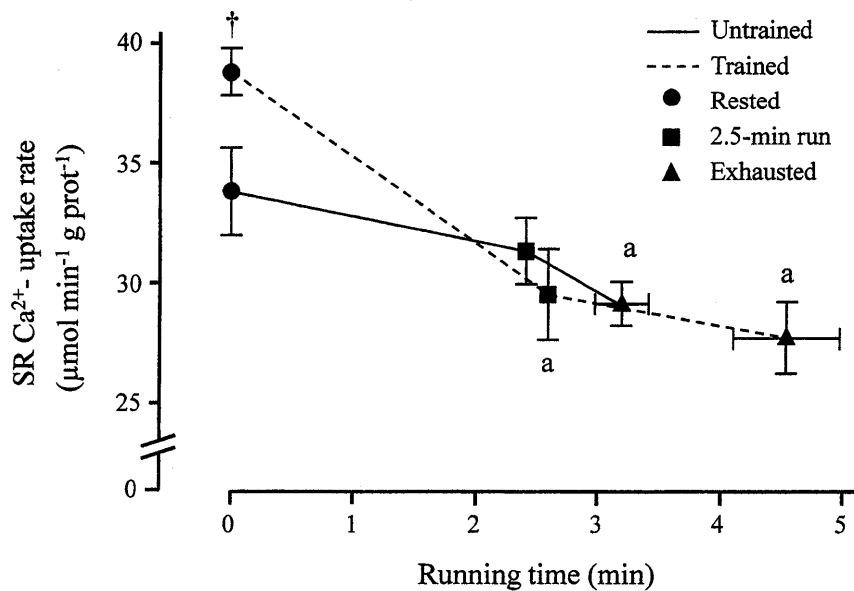


Fig. 3. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-uptake rate during exercise. For treatment of animals, see legend to Fig. 1. Values are means \pm SE (n=7). [†]P<0.05, vs. rested muscles from untrained rats. ^aP<0.05, vs. rested muscles from respective (untrained or trained) groups.

った。Ca²⁺ 取り込み速度では、unTr-R 群と Tr-R 群間に有意な違いがみられ (P<0.05; Fig. 3), 前者に対して後者では12.7%の高値が観察された。運動による Ca²⁺ 取り込み速度の変化は、SR Ca²⁺-ATPase 活性でみられたものと類似しており、全個体を対象とした両パラメーター間には有意な関係が観察された (P<0.01)。

C. ATPase カルボニル量

unTr 群と Tr 群の両方において、安静群および2.5分運動群と比べ、疲労困憊群では ATPase カルボニル量に約2倍の高値が認められた (P<0.05; Fig. 4)。Tr 群と unTr 群間での比較では、安静群および2.5分運動群だけでなく、走行時間が異なった疲労困憊群にも有意な差異は認められなかった。全個体を対象に、ATPase カルボニル量と SR Ca²⁺

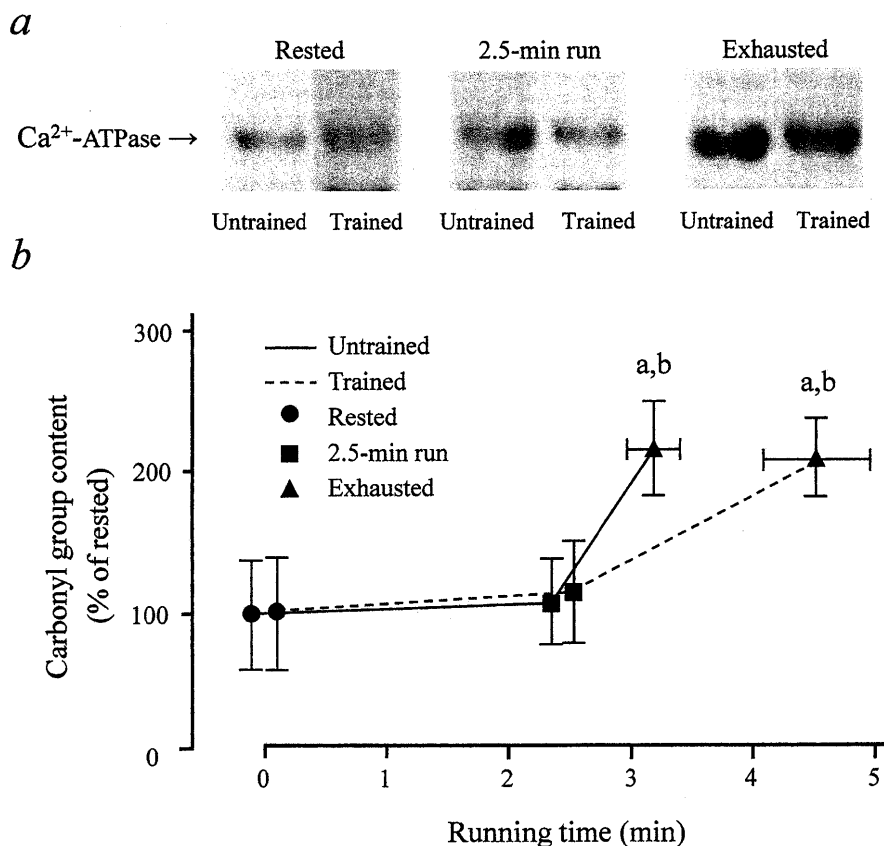


Fig. 4. Immunoblot analysis for 2, 4-DNPH-reactive carbonyls in microsomal fractions (a) and changes of carbonyl contents in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase protein during exercise (b). Equal amounts of microsomal proteins in the SR were applied to each lane on 10% polyacrylamide gels. SR Ca^{2+} -ATPase protein is marked by arrow (a). The carbonyl contents were evaluated by the densitometry of immunoblots (b). For treatment of animals, see legend to Fig. 1. The results are expressed as percentages of rested muscles from untrained rats. Values are means \pm SE ($n=7$). ^a $P < 0.05$, vs rested muscles from respective (untrained or trained) groups. ^b $P < 0.05$ vs 2.5-min run muscles from respective groups.

-ATPase および Ca^{2+} 取り込み速度との関係を検討したところ (Fig. 5 a, b), 有意な負の相関関係があることが示された。

D. SR Ca^{2+} -ATPase のタンパク質量

Fig. 6 に SR Ca^{2+} -ATPase のクーマシーブリアントブルー染色 (a) および SR Ca^{2+} -ATPase 1a のウェスタンブロット (b) の典型例を示した。これらをデンシトメーターにより定量したところ, SR Ca^{2+} -ATPase の全タンパク質量および SR Ca^{2+} -ATPase 1a の量に, トレーニングあるいは一過性の運動に起因する変化はみられなかった。SR Ca^{2+} -ATPase 1a の結果はまた, ウェスタンブロットにおいて, 全てのサンプルでほぼ同量の SR Ca^{2+} -ATPase タンパク質が膜に転写されたことを示し, 前述の予備実験の結果とともに, 本実験で得られた

ATPase カルボニル量のデータの妥当性を裏付けるものである。

IV. 考 察

Hill & Kupalov¹⁶⁾による先駆的な研究以来, 解糖系の代謝が亢進するために生ずる乳酸性アシドーシスは, 強度の高い運動において筋が疲労する主要な原因の1つであると考えられてきた。しかしながら, 生理的な温度下では pH が低下しても張力や収縮速度は, 従来考えられてきたほど大きく減少するわけではないことが報告されるようになり¹⁷⁾, 乳酸と筋疲労の因果関係については, 再考を要する時期にあると思われる。近年, 乳酸に代わって, SR の機能の変化が筋疲労の原因として注目を集めている^{19,20)}。

運動強度が高い場合でも低い場合でも, 疲労困憊

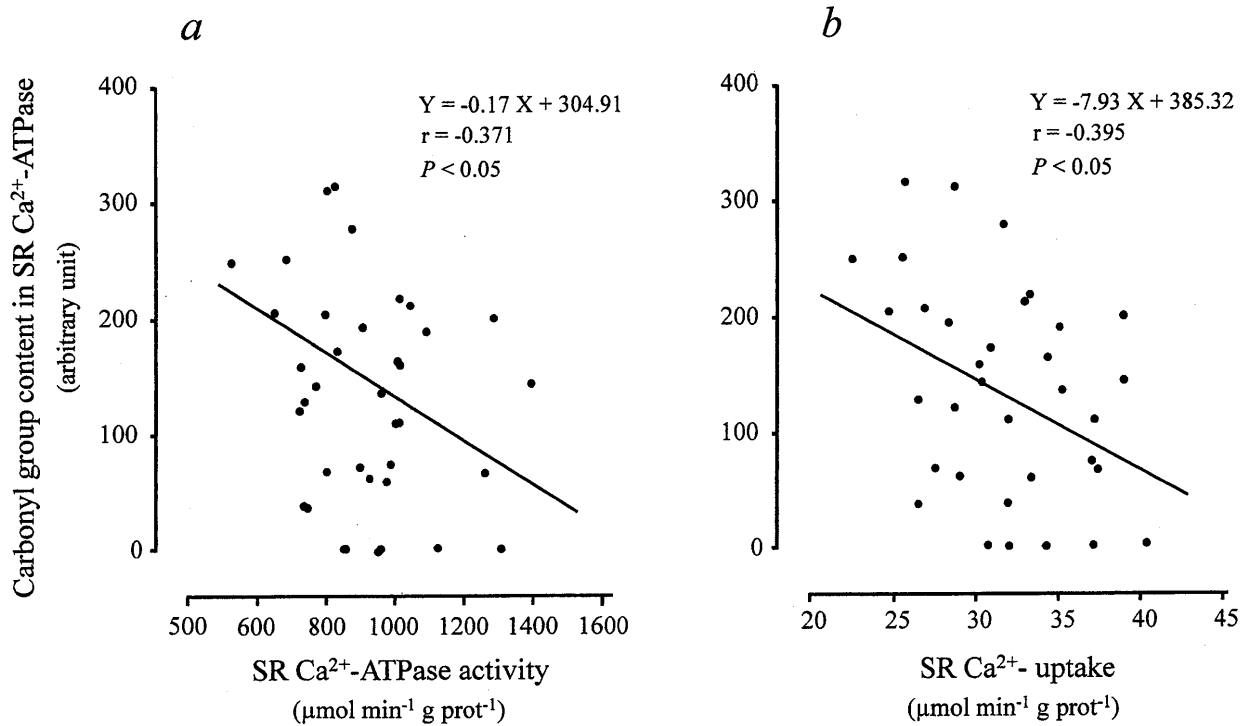


Fig. 5. Plot of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase activity vs. carbonyl group content in SR Ca^{2+} -ATPase protein (a) and SR Ca^{2+} -uptake rate vs. carbonyl group content in SR Ca^{2+} -ATPase protein (b). Plots include values of all samples. There are a negative relationship between the carbonyl group content and SR Ca^{2+} -ATPase activity and carbonyl group content and SR Ca^{2+} -uptake rate.

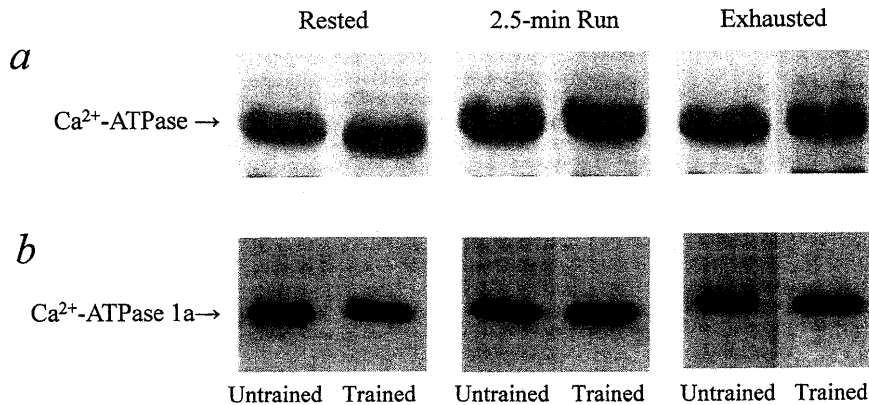


Fig. 6. Electrophoretic analysis of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (a) and SR Ca^{2+} -ATPase 1a (b). Equal amounts of microsomal proteins in the SR were applied to each lane on 10% polyacrylamide gels. Shown are Coomassie blue-stained gels (a) and identical immunoblots labeled with monoclonal antibody specific to SR Ca^{2+} -ATPase 1a (b). SR Ca^{2+} -ATPase protein and SR Ca^{2+} -ATPase 1a protein are marked by arrow.

に至るまで運動を行うと、主働筋においてSRの機能が低下することが報告されており^{2,5,6,21)}、本研究でもこれらの先行研究と一致した結果が得られた。強度の高い運動では、無機リン酸の濃度は25~40 mMにまで、また筋線維の内部にはクレアチンキナーゼが作動しない部位が局所的にあり、そのよ

うな部位ではADPの濃度は0.2~3 mMにまで上昇する²²⁾。これらの濃度が高まると、SR Ca^{2+} -ATPaseが通常とは逆方向に作動することが知られており²³⁾、生体内ではこのような代謝物の作用により、SRの Ca^{2+} 取り込み能力が低下することは十分に考えられる。一方、本研究のように、in

in vitro で安静時の細胞内環境と類似した溶液を用いて SR の機能が測定された場合、代謝物の一過性の影響は排除され、観察される機能の変化は、タンパク質の構造が変化したためであることが指摘されている^{4,24)}。

SR Ca^{2+} -ATPase には酸化修飾を受けやすいペプチドが6つ存在し、そのうちの1つは ATP 結合部位にある²⁵⁾。Viner et al.²⁵⁾ は、このペプチドを酸化すると SR Ca^{2+} -ATPase が二量体を形成するが、これはペプチドに含まれるチロシンが架橋を形成するためであること報告している。このような *in vitro* の実験結果に加え、疲労困憊に至るまで運動を行なわせた筋において、SR Ca^{2+} -ATPase の ATP 結合部位に実際に構造的な変化が生ずることも示されている²⁶⁾。SR Ca^{2+} -ATPase の構造の変化を招来する成因としては、筋活動中その濃度が高まることが知られている ROS をあげることができる。

有機物が酸化されると、炭素と酸素が共有二重結合を形成し、カルボニル基($>\text{C}=\text{O}$)が生成される。酸化が進むほど、含まれるカルボニル基の量が増加することから、その含有量は有機物がどの程度酸化修飾を受けたかの指標として用いられている²⁷⁾。本研究でもこの反応を利用し、運動中 SR Ca^{2+} -ATPase が受けた酸化修飾の度合いをウェスタンプロットにより検討し(Fig. 4)、高強度ランニング運動を疲労困憊に至るまで行なうと、ATPase カルボニル量が約2倍に増加することが観察された。Klebl et al.⁸⁾ および Matsunaga et al.²⁸⁾ は、電気刺激を用いた一連の研究から、このように SR Ca^{2+} -ATPase が酸化修飾を受けることが、激しい収縮活動を負荷した筋において SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下する素因の1つであることを指摘している。Fig. 5a に示されるように、SR Ca^{2+} -ATPase 活性と ATPase カルボニル量の間に負の相関関係が認められ、これは Klebl et al.⁸⁾ および Matsunaga et al.²⁸⁾ の指摘を支持する結果である。

本研究で得られた最も重要な知見は、トレーニングによって疲労困憊に至るまでの時間が平均41.8%伸びたにも関わらず、疲労困憊時における SR Ca^{2+} -ATPase 活性、 Ca^{2+} 取り込み速度および ATPase カルボニル量に、Tr 群と unTr 群間で差異がみられなかったことである。筋収縮中、細胞内

の酸化状態が、経時的にどのように変化するかについては明らかになっていない。本研究では、運動開始後の二時点(2.5分後および疲労困憊時)の変化しか検討しておらず、本研究で得られた結果からこの点について明言することはできない。しかしながら、unTr 群での2.5分(150秒)時では、ATPase カルボニル量は増加していないことを考慮すると、SR Ca^{2+} -ATPase の酸化は、運動中段階的に進むのではなく、疲労困憊に至る前(平均疲労困憊時間:191秒)の比較的短い時間の間に急激に進行するものと考えられる。Tr 群においても unTr 群と同様の変化が生ずるならば、トレーニングによって、SR Ca^{2+} -ATPase タンパク質の急激な酸化が始まる時間が遅延したものと推察される。このことを立証するためには、さらに詳細に運動中の経時的変化を検討する必要がある。

2.5分運動群では、ATPase カルボニル量が増加していないにもかかわらず、SR Ca^{2+} -ATPase 活性は低下したこと、また、ATPase カルボニル量と SR Ca^{2+} -ATPase 活性との相関関係は必ずしも高いものではないことから、酸化以外の要因も SR Ca^{2+} -ATPase タンパク質の構造的な変化に関与しているものと思われる。これについては、筋グリコーゲンに関する興味深い報告がなされている²⁹⁻³¹⁾。SR の膜には、グリコーゲンおよびグリコーゲンフォスフォリラーゼ(glycogen phosphorylase; GP)が結合していることが知られている。Cuenda et al.²⁹⁾ は SR を含む溶液に GP を添加すると、SR Ca^{2+} -ATPase の ATP 結合部位の構造が、ATP に対する親和性が高い状態に変化することを *in vitro* の実験から示している。この知見は、SR に付着する GP (SR-GP)の量的な減少が、SR Ca^{2+} -ATPase の機能にマイナスに作用することを示唆している。GP はグリコーゲンを介して SR に付着しているため、筋収縮中、GP がグリコーゲンを分解すると、SR-GP は SR から解離することになる。Lees et al.³⁰⁾ は、収縮を繰り返し負荷した筋では、SR の Ca^{2+} 取り込み速度と SR-GP の量が並行して低下することを観察し、グリコーゲンが SR-GP の作用を介して SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を及ぼしていると指摘している。しかしながら、近年なされた Mishima et al.³¹⁾ の報告では、グルコアミラーゼによって SR-GP の量を著しく低下させても、SR Ca^{2+} -

ATPase 活性は変化しないことが認められている。

Ørtenblad et al.³²⁾は、高強度トレーニングによってSRの機能が向上するのは、筋細胞に含まれるSR Ca²⁺-ATPaseのタンパク質量が増加するためであることを、ヒトを対象とした研究によって示している。本研究においても、トレーニングに起因するSRのCa²⁺取り込み速度の増加が観察されたが、SR Ca²⁺-ATPaseの量に変化は認められなかった。また、タンパク質の量的な変化が、Ca²⁺取り込み速度増加の成因であるならば、SR Ca²⁺-ATPase活性も増加するはずであるが、そのような変化はみられなかった。Ca²⁺取り込み速度増加のメカニズムについては不明であるが、SRのCa²⁺の取り込みが、SR Ca²⁺-ATPaseによるCa²⁺の輸送速度と、SRの膜などからのCa²⁺漏出速度の2つの要因によって規定されていることを考慮すると²³⁾、トレーニングによって漏出速度が抑制されたことが推察される。この問題については、今後さらに研究を進める必要がある。

以上の結果は、SR Ca²⁺-ATPaseタンパク質が酸化されることが、一過性の運動に起因してSR Ca²⁺-ATPase活性が低下する原因の1つであるとする知見を支持するとともに、トレーニングを行うことによって、一過性の運動の終盤に起こるSR Ca²⁺-ATPaseタンパク質の酸化の進行を抑制できる可能性があることを示すものである。

V. 総 括

高強度ランニングトレーニングと一過性の運動が筋小胞体(sarcoplasmic reticulum ; SR)のCa²⁺取り込み機能に及ぼす影響について、SR Ca²⁺-ATPaseの酸化に着目して検討した。Wistar系ラットをトレーニング群(Tr群)と非トレーニング群(unTr群)とに分け、Tr群には最大酸素摂取量の100%に相当する強度でのランニングトレーニングを8週間行なわせた。トレーニング終了後、両群を安静群(Tr-R群およびunTr-R群)と運動群とに分け、運動群にはトレーニングと同様の強度でのランニングを、2.5分間(Tr-2.5群およびunTr-2.5群)あるいは疲労困憊に至るまで(Tr-E群およびunTr-E群)行なわせた。外側広筋表層部および腓腹筋表層部を対象に分析を行い、以下の結果を得た。

(1) 疲労困憊に至るまでの平均走行時間は、

Tr-E群で270.9秒、unTr-E群で191.1秒であり、両群間の差異は統計的に有意であった。

- (2) SRのCa²⁺取り込み速度は、unTr-R群に比べTr-R群において12.7%の高値が認められた。一過性の運動によって、Tr群、unTr群ともに取り込み速度は低下したが、Tr-2.5群とunTr-2.5群間およびTr-E群とunTr-E群間に、有意な差異は観察されなかった。
- (3) 一過性の運動によってSR Ca²⁺-ATPase活性も低下したが、Tr-R群とunTr-R群間、Tr-2.5群とunTr-2.5群間およびTr-E群とunTr-E群間に、有意な差異はみられなかった。
- (4) SR Ca²⁺-ATPaseに含まれるカルボニル基(ATPaseカルボニル)の量は、Tr群、unTr群ともに安静群および2.5分運動群と比べ、疲労困憊群において約2倍の値がみられた。
- (5) ATPaseカルボニル量とSR Ca²⁺-ATPase活性およびSR Ca²⁺取り込み速度との間に、負の相関関係が認められた。

以上の結果は、SR Ca²⁺-ATPaseタンパク質の酸化が、一過性の運動に起因して生じるSR Ca²⁺-ATPase活性の低下を説明できうる原因の1つであるとする知見を支持するとともに、高強度運動から構成されるトレーニングは、一過性の運動の終盤に生じるSR Ca²⁺-ATPaseのタンパク質酸化の進行を遅延する可能性を示すものであった。

本研究は、日本学術振興会科学研究費(No. 16500419, 研究代表者 松永 智)の補助を受けて実施されたものである。

(受理日 平成20年2月28日)

文 献

- 1) Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y., A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.*, (1985), **260**, 3440-3450.
- 2) Matsunaga, S., Yamada, T., Mishima, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M. & Wada, M., Effects of high-intensity training and acute exercise on in vitro function of rat sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Appl. Physiol.*, (2007), **99**, 641-649.
- 3) Holloway, G. P., Green, H. J. & Tupling, A. R., Differential effects of repetitive activity on sarcoplasmic reticulum responses in rat muscles of different oxida-

- tive potential. *Am. J. Physiol.*, (2006), **290**, R393-R404.
- 4) Mishima, T., Yamada, T., Matsunaga, S. & Wada, M., N-acetylcysteine fails to modulate the in vitro function of sarcoplasmic reticulum of diaphragm in the final phase of fatigue. *Acta Physiol. Scand.*, (2005), **184**, 195-202.
 - 5) 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.
 - 6) Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T. & Wada, M., Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflügers Arch.*, (2003), **446**, 394-399.
 - 7) Favero, T. G., Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.*, (1999), **87**, 471-483.
 - 8) Klebl, B. M., Ayoub, A. T. & Pette, D., Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.*, (1998), **422**, 381-384.
 - 9) Saltin, B. & Gollnick, P. D., Skeletal muscle adaptability : significance for metabolism and performance, In., Peachey, L. D., *Handbook of physiology*, section 10 Skeletal muscle, Waverly Press Inc., Maryland, (1983), 555-631.
 - 10) 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.
 - 11) Simonides, W. S. & van Hardeveld, C., An assay for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in muscle homogenate. *Anal. Biochem.*, (1990), **191**, 321-331.
 - 12) Ward, C. W., Spangenburg, E. E., Diss, L. M. & Williams, J. H., Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum uptake and release rates. *Am. J. Physiol.*, (1998), **275**, R99-R104.
 - 13) Wada, M., Inashima, S., Yamada, T. & Matsunaga, S., Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *J. Appl. Physiol.*, (2003), **94**, 923-929.
 - 14) Oakley, B. R., Kirsch, D. R. & Morris, N. R., A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, (1980), **105**, 361-363.
 - 15) Nakamura, H., Jilka, R. L., Boland, R. & Martonosi, A. N., Mechanism of ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum and the role of phospholipids. *J. Biol. Chem.*, (1976), **251**, 5414-5423.
 - 16) Hill, A. V. & Kupalov, P., Anaerobic and aerobic activity in isolated muscle. *Proc. R. Soc. Lond. Series B*, (1929), **105**, 313-322.
 - 17) Westerblad, H., Bruton, J. D. & Lännergren, J., The effect of intracellular pH on contractile function of intact, single fibres of mouse muscle declines with increasing temperature. *J. Physiol. (Lond.)*, (1997), **500**, 193-204.
 - 18) Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248-254.
 - 19) Westerblad, H., Allen, D. G. & Lännergren, J., Muscle fatigue : lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol. Sci.*, (2002), **17**, 17-21.
 - 20) Wada, M., Mishima, T. & Yamada, T., The role of lactic acid in muscle contraction. *Japan J. Phys. Educ. Hlth. Sport Sci.*, (2006), **51**, 229-239.
 - 21) Duhamel, T. A., Green, H. J., Perco, J. G. & Ouyang, J., Effects of prior exercise and a low carbohydrate diet on muscle sarcoplasmic reticulum function during cycling in females. *J. Appl. Physiol.*, (2006), **101**, 695-706.
 - 22) Steele, D. S. & Duke, A. M., Metabolic factors contributing to altered Ca^{2+} regulation in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, (2003), **179**, 39-48.
 - 23) 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.
 - 24) Ørtenblad, N., Sjogaard, G. & Madsen, K., Impaired sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release rate after stimulation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, (2000), **89**, 210-217.
 - 25) Viner, R. I., Krainev, A. G., Williams, T. D., Schoenich, 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.
 - 26) 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.
 - 27) Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. & Stadtman, E. R., Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, (1990), **186**, 464-478.
 - 28) Matsunaga, S., Harmon, S., Gohlsch, B., Ohlendieck, K. & Pette, D., Inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, (2001), **22**, 685-691.
 - 29) Cuenda, A., Centro, F. & Gutierrez-Merino, C., Modulation by phosphorylation of glycogen phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett.*, (1991), **283**, 273-276.
 - 30) Lees, S. J., Franks, P. D., Spangenburg, E. E. & Williams, J. H., Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J. Appl. Physiol.*, (2001), **91**, 1638-1644.
 - 31) Mishima, T., Sugiyama, M., Yamada, T., Sakamoto, M.

- & Wada, M., Effects of reduced glycogen on structure and in vitro function of rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Pflügers Arch.*, (2006), **452**, 117-123.
- 32) Ørtenblad, N., Lunde, P. K., Levin, K., Andersen, J. L. & Pedersen, P. K., Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release following intermittent sprint training. *Am. J. Physiol.*, (2000), **279**, R152-R160.