

## 筋小胞体の構造および筋活動に伴うその機能の変化

和田正信<sup>1)</sup> 稲嶋修一郎<sup>1)</sup> 安田俊広<sup>2)</sup> 松永 智<sup>3)</sup>

## Structure of sarcoplasmic reticulum and activity-induced alteration in its function

Masanobu Wada<sup>1</sup>, Shuichiro Inashima<sup>1</sup>, Toshihiro Yasuda<sup>2</sup> and Satoshi Matsunaga<sup>3</sup>

## Abstract

Repeated contractions of skeletal muscle lead to a decline of force known as fatigue. The exact cause of muscular fatigue probably involves numerous factors which influence force production in a manner dependent on muscle fiber type and activation pattern. However, a growing amount of evidence implicates alteration of intracellular  $Ca^{2+}$  handling as a major contributor to fatigue. These changes are known to occur secondary to reductions in the rates of  $Ca^{2+}$  uptake and release by the sarcoplasmic reticulum (SR). In this brief review, we focus on two major aspects: 1) molecular mechanisms of the  $Ca^{2+}$  uptake and release process, focusing on  $Ca^{2+}$ -ATPase protein and the ryanodine receptor; and 2) several factors that may be responsible for dysfunction of the SR resulting from contractile activity. Factors that might account for diminished function of the SR include a fall in internal pH, increased  $Ca^{2+}$  concentration, modification by reactive oxygen species, depletion of high-energy phosphate, and accumulation of inorganic phosphate.

**Key words:** muscular fatigue, muscle contraction, exercise, calcium

(Japan J. Phys. Educ. Hlth. Sport Sci. 46 : 443-459, September, 2001)

- 1) 広島大学総合科学部  
〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1  
2) 福島大学教育学部  
〒960-1296 福島市金谷川1  
3) 大阪市立大学保健体育科研究室  
〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138  
連絡先 和田正信

- 1) Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University  
1-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8521  
2) Faculty of Education, Fukushima University  
1, Kanayagawa, Fukushima 960-1296  
3) Institute of Health Science and Physical Education, Osaka City University  
3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585  
Corresponding author wada@hiroshima-u. ac. jp

キーワード：筋疲労，筋収縮，運動，カルシウム

## I. はじめに

現在，筋疲労は「継続的な収縮活動に伴う張力の低下」と定義されているが (Fitts, 1994)，この分野に関する研究は1868年のMarey (1868)のものにまで遡ることができる。以来，1世紀以上にわたって，多くの研究者が筋が疲労する成因を解明しようと努力してきたにもかかわらず，正確なメカニズムについては現在も不明な点が少なくない。筋細胞内において，カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度を調節する役割を担っているのは，袋状膜構造をなす筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) であり，近年，疲労の原因となっていると考えられる多くの部位の中で，特にこの器官の変化が注目されている (Williams and Klug, 1995; Favero, 1999)。我々も1996年に「運動による筋小胞体の機能の変化」と題する総説を発表したが (Wada and Tsuchimochi, 1996)，その後数多くの新見解が報告され，この領域の研究は新たな局面を迎えようとしているように思われる。そこで本稿では，最新のトピックスを中心に，筋疲労とSRとの関係について再考してみたい。

## II. 筋小胞体の構造と機能

### A. 全体構造

SRは筋原線維を取り囲むように位置しており (Fig. 1)，両端の膨らんだ部分を終末槽 (terminal cisternae) と，それ以外の部分を縦走管 (longitudinal tubule) という (Fig. 2)。形質膜が筋線維の内部に落ち込むようにして形づくられている器官を横行小管 (transverse tubule; T管) といい，哺乳類の骨格筋では，T管は明帯と暗帯の境目に規則正しく配列されている。2つの終末槽が1つのT管をはさむように位置しており，この部位は三つ組み構造 (triad) と呼ばれる (Ruegg, 1988)。

SRの主な生理機能は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の制御であり，大部分の  $\text{Ca}^{2+}$  は通常SRの膜内に貯蔵されているため，筋筋質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $10^{-7}\text{M}$  以下に保

たれている。 $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵，放出，取り込みという3つの機能を成就するために，SRの膜や内腔には数種類のタンパク質が存在しており，それらの中で主なものとしては，カルセクエストリン，リアノジン受容体 (ryanodine receptor; RyR)， $\text{Ca}^{2+}$  依存性ATPase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) などあげることができる (Fig. 2)。

SR内腔の終末槽に局在するカルセクエストリンは  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパクであり (Damiani and Margreth, 1990)， $\text{Ca}^{2+}$  はカルセクエストリン1分子当たり43個の割合で結合し，貯蔵されている。

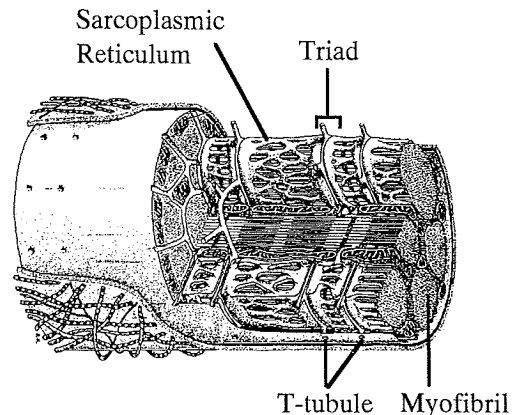


Fig. 1 Sarcomeric array of membrane system in skeletal muscle fiber.

The sarcoplasmic reticulum (SR) forms tubules and cisternae running longitudinally along the narrow spaces between the myofibrils. The triad consists of a transversely running transverse (T) tubule and a pair of the adjacent terminal cisternae of SR. (from Yamamoto and Maruyama, 1986)

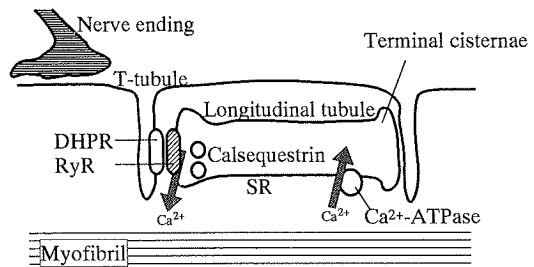


Fig. 2 A diagrammatic representation of the major components of a muscle cell involved in excitation-contraction coupling.

Abbreviations: SR, sarcoplasmic reticulum; DHPR, dihydropyridine receptor; RyR, ryanodine receptor.

終末槽上のT管側に位置するRyRはCa<sup>2+</sup>放出チャンネルとして作用し、T管からの刺激に応じてCa<sup>2+</sup>を筋形質へ放出する。また、Ca<sup>2+</sup>-ATPaseは縦走管上に点在し、筋形質からSR内腔へCa<sup>2+</sup>を能動輸送するCa<sup>2+</sup>ポンプの役割を果たしている。

Ca<sup>2+</sup>-ATPaseはSRの主要な構成要素であり、速筋線維の場合、SRの全タンパクのおよそ80%を占める (Dux, 1993)。

## B. Ca<sup>2+</sup>放出の仕組み

T管に神経インパルスが到達し膜に脱分極が起こると、SRからCa<sup>2+</sup>が放出されることは古くから知られていたが、T管とSRの終末槽との間に存在する15nmほどの間隙をT管側からのシグナルがどのようにしてSR側へ伝わるのかという問題は、筋生理学者の関心の的であったにもかかわらず長い間明確ではなく、現在でも完全には分かっていない。しかしながら、ここ十数年間の研究により、シグナル伝達に2つのタンパク質が中心的な役割を演じていることが明らかとなってきた。1つは、T管の膜上に存在するジヒドロピリジン受容体 (dihydropyridine receptor; DHPR) であり、他の1つは前述のRyRである (Fig. 2)。

### 1. ジヒドロピリジン受容体 (DHPR) の役割

電子顕微鏡を用いてT管膜上を観察すると、4つの小片が規則正しく並んでいるのが確認され、この4つの小片は1まとめにしてtetradと呼ばれる。各々の小片のサイズはDHPRの分子量と一致しており、tetradは4つのDHPR分子から構成されていると考えられている (Takekura et al., 1994)。DHPRがT管においてボルテージセンサーとして作用していることは広く認められているが、感知した電位の変化が、どのようなかたちで、またどのような経路でCa<sup>2+</sup>放出を誘因するシグナルとして、SRへと伝達されるのかについての詳細は明らかになっていない。しかしながら、三つ組み構造付近のATPの濃度が低下すると、SRからのCa<sup>2+</sup>放出が抑制されることが認められており (Allen et al., 1997)、ATPを利用したDHPRタンパクのリン酸化が、シグナル伝達に何らかの役割を果たして

いるものと考えられている (Westerblad et al., 1998)。

DHPRは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の5つのサブユニットから構成されているが、これらのうち $\alpha 1$ サブユニットが遺伝的に欠損しているとDHPRが発現されないこと (Powell and Fambrough, 1973; Adams et al., 1990)、また、リン酸化される部位を複数含んでいるのは $\alpha 1$ と $\beta$ であることから (Favero, 1999)、この2つのサブユニットがシグナル伝達に必須なタンパクであることが示唆されている。他のサブユニットの役割については、よく分かっていない。

### 2. リアノジン受容体 (RyR) の役割

1980年代、植物アルカロイドであるリアノジンが、開口状態にあるSRのCa<sup>2+</sup>放出チャンネルに結合することが発見されたことが (Fleischer et al., 1985; Meissner, 1986)、このチャンネルがRyRと呼ばれるようになった由来である。RyRには3種類のアイソフォームが存在し、RyR-1は骨格筋に、RyR-2は心筋に、RyR-3は脳に発現しており、各々独立した遺伝子からコードされている。

筋線維の縦断面を電子顕微鏡で観察すると、RyRの一部がSRからT管に向けて突出しているようすが観察され、その形状が足の形に似ていることから、この部位はfootと呼ばれている (Inui et al., 1987)。RyR-1は4つのサブユニットが集まってできた四量体であり、1つのサブユニットの分子量は560,000Daである (Takeshima et al., 1989)。このサブユニットは5,035個のアミノ酸から構成されており、N末端側はfoot部を、C末端側はチャンネルの開口部を形成していると考えられている。

前述のように、SR内腔ではCa<sup>2+</sup>は、終末槽に局在しているカルセクエストリンと結合した形で貯蔵されている。RyRが開口するとCa<sup>2+</sup>はカルセクエストリンから解離し、筋形質へと放出され、その放出速度はRyR 1個当たりおよそ240個Ca<sup>2+</sup>/msecといわれている (Oetliker, 1982)。SRがCa<sup>2+</sup>を十分蓄えた状態では、SR内腔と筋形質とではCa<sup>2+</sup>濃度は10,000倍以上異なり、Ca<sup>2+</sup>の移動はこの濃度勾配による拡散によってなされ、移動そ

れ自体にはエネルギーを必要としない。

SRからのCa<sup>2+</sup>放出は、SR内外のCa<sup>2+</sup>濃度勾配以外では、RyRが開口状態になる確率と平均開口時間の2つによって主に規定されるが、生体内でどのようにしてRyRの開口・閉口が制御されているのかについては、DHPRからのシグナルと同様、よく分っていない。しかしながら、ある特定の条件下に置かれると、RyRが閉から開あるいは開から閉になることが知られており、生体内においてもそのような経路がRyRの制御に関与している可能性がある。例えば、SH基を修飾する作用を持つ酸化剤や重金属にSRを暴露するとCa<sup>2+</sup>の放出が起こることなどは (Ward et al., 1998), SRタンパクを構成するSH基の状態がRyRの活動に影響を及ぼすことを示す事実である。

DHPRはCa<sup>2+</sup>チャンネルでもあり、筋細胞外部のCa<sup>2+</sup>が細胞内部に流入する経路の1つである。この経路を通してCa<sup>2+</sup>が細胞内部に入り、筋形質のCa<sup>2+</sup>の濃度がわずかに高まると、それに反応してRyRが開口しSRによるCa<sup>2+</sup>の放出が招来される。この現象をCa<sup>2+</sup>誘発性Ca<sup>2+</sup>放出 (Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release; CICR) という (Endo et al., 1970; Hymel et al., 1988; Lai et al., 1988)。心筋細胞ではこのCICRによってCa<sup>2+</sup>の放出が起こるが、骨格筋の場合、Ca<sup>2+</sup>が存在しない条件下においてもRyRが機能することが認められており、骨格筋では、CICRはCa<sup>2+</sup>放出の主たるメカニズムではないと考えられている。

### C. Ca<sup>2+</sup>取り込みの仕組み

筋形質に放出されたCa<sup>2+</sup>を再び内腔に取り込む役割を担うタンパクが、分子量約11,000DaのCa<sup>2+</sup>-ATPaseであり、ATP 1分子の分解によってCa<sup>2+</sup> 2分子が輸送される。Ca<sup>2+</sup>-ATPaseによるCa<sup>2+</sup>取り込みの反応機構をFig. 3に示した。Ca<sup>2+</sup>-ATPaseは、Ca<sup>2+</sup>に対する親和性が高い状態 (E1) と低い状態 (E2) の2つのコンフォメーションをとり、E1の時はCa<sup>2+</sup>結合部は筋形質側を向いている。Ca<sup>2+</sup>の取り込みは、筋形質に存在する1分子のATPと2分子のCa<sup>2+</sup>がCa<sup>2+</sup>-ATPaseに結合し、Ca<sup>2+</sup>・E1・ATP複合体が形成されることから始

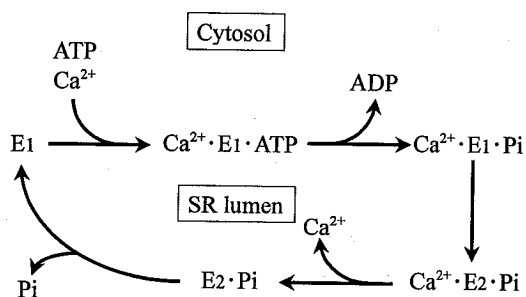


Fig. 3 The reaction cycle of sarcoplasmic reticulum calcium pump.

E1 and E2 represent Ca<sup>2+</sup>-ATPase conformations with high and low calcium affinity, respectively.

まる。次に、ATPの加水分解が起こるが、分解によりできる2つの生成物のうち、ADPは筋形質へと遊離するが、無機リン酸 (inorganic phosphate; Pi) はE1に結合する。このリン酸化されたCa<sup>2+</sup>-ATPaseにCa<sup>2+</sup>が結合した状態 (Ca<sup>2+</sup>・E1・Pi) は、リン酸化中間体と呼ばれる。リン酸化中間体が形成されると同時に、Ca<sup>2+</sup>結合部のSR内腔への転移、すなわちCa<sup>2+</sup>の輸送が生じる。すると、リン酸化中間体はCa<sup>2+</sup>に対して親和性の低い状態 (Ca<sup>2+</sup>・E2・Pi) になり、Ca<sup>2+</sup>は中間体から解離し、SR内腔で遊離することになる。残されたE2・PiからPiが解離すると、Ca<sup>2+</sup>-ATPaseは再びE1へと変化し、Ca<sup>2+</sup>取り込みのサイクルが終了する。SR内腔のCa<sup>2+</sup>濃度が高まるとCa<sup>2+</sup>-ATPase活性が低下することが知られている。この現象をback-inhibitionというが、これはE2・PiからのPiの解離速度が低下することに成因があるとされている (Yamada and Tonomura, 1972)。

Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの全一次構造はすでに決定されているが、その三次構造については不明な点が多い。近時、Toyoshima et al. (2000) は、骨格筋SRの結晶構造を2.6オングストロームレベルという極めて高い分解能で解析し、Ca<sup>2+</sup>が結合した状態でのSRの立体像を捕えることに成功している。今後、更なる研究の進展によって、Ca<sup>2+</sup>輸送のメカニズムの詳細が明らかとなっていくであろう。

### Ⅲ. 筋線維タイプと筋小胞体

#### A. 筋線維の分類

電気的な刺激が負荷されると、筋線維は収縮を開始するが、刺激が跡絶えるとやがて弛緩にむかう。一回の刺激による筋の収縮・弛緩のサイクルを単収縮 (twitch) といい、この単収縮に要する時間から、筋線維は1サイクルに150msec以上を要する遅筋 (slow-twitch; ST) 線維と50~80msec程度で終了する速筋 (fast-twitch; FT) 線維とに大別することができる。ST線維はtype I線維と、またFT線維はtype II線維とも呼ばれる。両者ともにサブタイプが存在し、齧歯類ではtype I線維はI $\alpha$ とI $\beta$ の2種類に、type II線維はIIA, IIBおよびIIDの3種類に細分される。

このような筋線維タイプは、線維に発現しているミオシン重鎖 (heavy chain; HC) のアイソフォームの種類によって決まり、各々筋線維タイプの名称と呼応するHCのアイソフォーム (HCI $\alpha$ , HCI $\beta$ , HCIIA, HCIIB, HCIID) が含まれている (Peuker et al., 1998; Pette et al., 1999)。心筋はtype I $\alpha$ とtype I $\beta$ から、一方骨格筋は5種類全ての線維から構成されている。ただし、骨格筋に関しては、type I $\alpha$ 線維は存在したとしてもごく僅かであること、また含まれる5種類の筋線維タイプの構成比率は、筋の種類によって大きく異なることの2つは、念頭に置くべき事実である。

#### B. Ca<sup>2+</sup>放出・取り込み能力の違い

筋線維の収縮・弛緩速度は、筋原線維の特性だけでなく、SRのCa<sup>2+</sup>放出・取り込み能力にも左右されることが知られており (Dux, 1993; Ortenblad et al., 2000b)、SRは筋線維の機能を規定する重要な器官の1つであるといえる。ラットにおいてヒラメ筋 (soleus; SOL) と外側広筋表層部 (superficial region of vastus lateralis; VLS) のCa<sup>2+</sup>放出・取り込み速度を比較すると、前者と比べ後者において、取り込み速度に約4倍、放出速度に約2倍の高値が観察される (Fig. 4)。ヒラメ筋は90%以上がtype I線維で、外側広筋は全てが

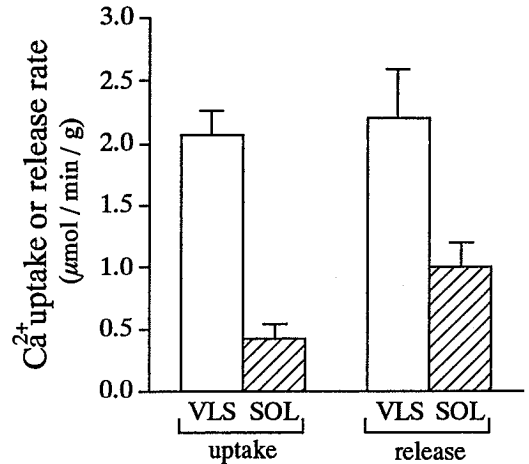


Fig. 4 Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> uptake and release rate in the soleus (SOL) muscle and the superficial region of the vastus lateralis (VLS) muscle of the rat. Values are means  $\pm$  SD. (Inashima and Wada, unpublished data)

type II線維で構成されており、両筋の違いはtype I線維とtype II線維の違いとみなすことができる。このようにtype I線維とtype II線維とで、SRの機能が異なる原因の1つは、SRの発達の度合に差異があることにあり、筋線維全体に占めるSRの容量は、type I線維で3%程度であるのに対して、type II線維では約9%である (Davey and Wong, 1980)。type I線維あるいはtype II線維のサブタイプ間でSRの機能に違いがみられるのかどうかについては、必ずしも明確になっているわけではない。しかしながら、type IIA, IIBおよびIID線維間では収縮・弛緩特性に大きな差異がないとする Larsson et al. (1991) の報告を考慮すると、少なくともtype II線維のサブタイプ間では顕著な違いはないものと考えられる。

#### C. Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの違い

##### 1. タンパク量

Ca<sup>2+</sup>の取り込みはCa<sup>2+</sup>-ATPaseの働きによってなされるため (Fig. 3)、このタンパクの特性がSRのCa<sup>2+</sup>ポンピング機能を大きく左右することになる。前述のように、type I線維とtype II線維とで

はSRの発達の度合も異なるが、それに加えSRの膜に点在するCa<sup>2+</sup>-ATPaseの量にも差異があるため (type II線維の方が多い), 筋線維に含まれるCa<sup>2+</sup>-ATPaseのタンパク量の差はさらに開くことになる。具体的な数値としては, Leberer and Pette (1986) が免疫組織化学的手法を用いて, type II線維はtype I線維の約6倍のタンパクを含んでいることを報告しており, この違いは両線維間にみられる弛緩速度の差異とほぼ一致する。

## 2. アイソフォーム

Ca<sup>2+</sup>-ATPaseタンパクには幾つかのアイソフォームがあり, その種類を表わす場合, sarco (endo) plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの略語であるSERCAが用いられることが多い。SERCAのアイソフォームは, SERCA1, SERCA 2およびSERCA 3の3種類に大別され, 各々異なる組織に特異的に分布している (Table 1)。SERCA1には1aと1bの2種類があり, どちらもtype II線維に含まれるが, SERCA1aは成熟した個体のみ, 一方, SERCA1bは新生児にのみ発現している (Brandl et al., 1986; Brandl et al., 1987)。ラビットの場合, SERCA1aは1,001個のアミノ酸残基から構成されている。SERCA1bは, SERCA1aのアミノ酸配列のC末端に, 7つ (Dux, 1993) あるいは8つ (鈴木, 1998) のアミノ酸が多く結合した構造をしている。このSERCA1aとSERCA1bのアミノ酸の数の違いによる機能の差異については, 詳細に解明されるには至っていない (Dux, 1993)。

SERCA1と同様, SERCA2にも2aと2bの2種類があり, 2aはtype I  $\alpha$  およびI  $\beta$  線維に, 一方, 2bは平滑筋, 脳などの細胞に主として含まれる

(Burk et al.; 1989, Lytton et al., 1989)。なお, SERCA2aは, 少量ではあるが平滑筋においてもその存在が確認される場合がある (MacLennan et al., 1985; Burk et al., 1989; Lytton et al., 1989)。ラビットのSERCA2aは997個のアミノ酸残基からなり, N末端から993残基までの配列はSERCA2bと共通である。SERCA1とSERCA2とでは, 全体の15%にアミノ酸配列の相違点があるが, その殆どがN末端でみうけられる。

非筋細胞でみられるSERCA3は (MacLennan, 1985; Burk et al., 1989; Lytton et al., 1989), 単独に発現しているわけではなく, 常にSERCA2bとともに観察される。このアイソフォームは, 小脳プルキンエ細胞, 結腸の分泌性上皮細胞, 肺や気管の上皮細胞あるいはリンパ系細胞の中で, Ca<sup>2+</sup>が伝達シグナルとして機能調節に大きく関与している細胞において多くみうけられる (Wu, et al., 1995)。

SERCA2を含むSRの膜においてのみ, 分子量22,000~25,000Daの5角形状のタンパク質であるホスホランバン (phospholamban) が存在する (Jorgensen and Jones, 1986)。52個のアミノ酸残基から構成されているこのタンパクの機能は, 主として心筋を対象に解析されており, 通常, SERCAと結合し酵素活性を抑制していることが知られている (James et al., 1989)。ホスホランバンがc-AMP依存性キナーゼあるいはカルモデュリン依存性キナーゼなどの作用でリン酸化され, SERCA2から解離するとすると, 酵素のCa<sup>2+</sup>に対する親和性が増し, 活性が増加する (Jakab and Kranias, 1988; LePeuch and Demaille, 1989)。この結果, SRによるCa<sup>2+</sup>取り込み速度は, 約2倍に増加することが報告されている (LePeuch and Demaille, 1989)。交感神経節末端から放出されるアドレナリンに反応し心臓の拍動数が増すのは, このホスホランバンのリン酸化を介した作用により, 心筋の弛緩速度が高まることが原因の1つである (Dux, 1993)。

ホスホランバンの脱リン酸化により, 再び酵素活性は抑制されることから, このタンパクはSERCA2の可逆的な抑制因子として捕えることが

Table 1. Sarco (endo) plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) isoforms identified in mammal

Nomenclature	Distribution
SERCA1a	IIA, IIB and IID fibers
SERCA1b	Neonatal fast muscle
SERCA2a	I $\alpha$ and I $\beta$ fibers
SERCA2b	Smooth muscle, brain
SERCA3	Non-muscle

できる (鈴木, 1998). SERCA1 からなる SR において, ホスホランバンが存在しない理由としては, type II 線維ではその機能的需要を充足するために, 極めて迅速な  $Ca^{2+}$  に取り込みが要求されるため, 進化の過程において, このタンパクによる機能抑制の必要性を失っていったためであると考えられている (Dux, 1993). なお, RyR に関しては SERCA とは異なり, type I 線維にも type II 線維にも同様のアイソフォーム (RyR-1) が発現しており, 両筋線維間にみられる  $Ca^{2+}$  放出速度の違いは, 単にこの受容体の量的な差異に成因があるものと思われる.

#### IV. トレーニングの影響

##### A. 持久性トレーニング

活動量の増加が筋線維に及ぼす影響を検討する手法の1つに, 筋を支配する神経に電極を取り付け, 電気刺激を負荷し筋を強制的に収縮させる方法がある. この方法によりラビットなどの実験動物の骨格筋を1ヶ月以上にわたり収縮させ続けると, 筋線維は type II 線維から type I 線維へとタイプ移行することが知られている (Pette, 1992). この筋線維のタイプ移行として観察される変化は, それまで fast type ミオシン重鎖 (HCII) が発現されていた筋線維において, このアイソフォームの合成が止まり, 代わって slow type である HCI が合成されるようになることに原因がある. HC のアイソフォームの発現の変容とともに, SR にも遅筋化の兆候を示す幾つかの変化がみられ, 質的な変化としては, SERCA2a およびホスホランバンが発現されるようになることが, また, 量的な変化としては SERCA の容量やこの酵素の活性が減少することがあげられる (Leberer et al., 1989). さらに, このような SERCA の変化とともに, RyR および DHPR のタンパク量の低下も生ずる (Ohlendieck et al., 1991).

type II 線維から type I 線維への移行が起こるほどの激しい持久性トレーニングを行うと, その程度は小さいものの, 電気刺激でみられるものと類似した変化が招来されることが Green et al. (1984)

によって報告されている. 彼らは最大酸素摂取量の約 80% の強度で 1 日 4 時間におよぶ走行トレーニングを 15 週間ラットに負荷し, 外側広筋深層部において, type I 線維の増加とともに SERCA のタンパク量が約 63% 減少したことを観察している.

type II 線維から type I 線維への移行が起こるのは, 例外的ともいえる極めて過酷なトレーニングが課された場合のみである. では, 通常行われるトレーニングでは, どのような変化が生ずるのであろうか.  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性あるいは  $Ca^{2+}$  取り込み能については, 低下するとする報告と (Kim et al., 1981; Belcastro, 1987), 変化しないとする報告があり (Madsen et al., 1994; Green et al., 1995), 一致した見解は得られていない. 我々もこの問題について検討し, 1 日 90 分のランニングを 10 週間ラットに負荷したラットの足底筋において,  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性が 13%,  $Ca^{2+}$  取り込み速度が 8% 低下したこと, すなわち前者を支持する結果を認めている (未発表資料). 研究間で異なる結果が得られた理由については, (1) SR に変化が招来される刺激閾値が, 統一した変化が観察されやすいミトコンドリアや fast type HC (HCIIA, HCIIB および HCID) などとは異なるため, トレーニングプロトコルのわずかな違いが反応応答に影響すること, (2) 筋線維タイプによって変化の様相が異なること, あるいは (3) SR のトレーナビリティが個体の年齢や種によって差異があることなどが推測される.

DHPR については 1 例の報告がなされており, 長指伸筋において電気刺激の場合とは逆に, タンパクの発現量が増加したことが認められている (Saborido et al., 1995). カルセクエストリン量あるいは RyR の数については, 変化がみられなかったことが示されているが (Klitgaard et al., 1989), DHPR の場合と同様報告数が少なく, 明確な結論をくだすためには, さらに多くのデータを収集する必要がある.

##### B. スプリントおよび筋力トレーニング

遅筋であるヒラメ筋に, 速筋を支配する運動神経細胞が発するシグナルに類似した高頻度の電気

刺激を負荷すると、筋細胞内の多くの器官において速筋化の兆候を示す変化が生ずることが認められている (Gundersen et al., 1988). SRについても例外ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseのタンパク量の増加がみられ、その程度は速筋である長指伸筋にほぼ匹敵するレベルまで達する (Gundersen et al., 1988). 仮に、トレーニングによって運動神経細胞が発するインパルスの頻度が変化するのであれば、電気刺激のような非生理学的な手法によらなくても、SRの速筋化を生じさせることが可能となると考えられるが、実際はどうであろうか。

これに関する先行研究では、否定的な見解を示すものが多く、例えば、Ortenblad et al. (2000a) はヒト外側広筋において、また Barnard et al. (1970) はモルモットの速筋において、スプリントトレーニングが $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み速度あるいは $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性を変化させる作用を持たないことを報告している。筋力トレーニングについても同様であり、SRの容量 (Alway et al., 1988) あるいは $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性 (Green, et al., 1995) にトレーニングによる変化は認められていない。唯一の例外がOrtenblad et al. (2000a) の報告であり、彼らはスプリントトレーニングを5週間行ったヒト外側広筋において、RyRの数および $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度が増加したことを観察している。スプリント・筋力トレーニングについても、持久性トレーニングの場合と同様報告数が少なく、トレーニング条件などを厳密に規定した詳細な研究を行う必要がある。

## V. 一過性の運動の影響

### A. $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みおよび放出能力の変化

疲労した筋ではSRの機能が低下していることは、多くの研究において認められてきたが (Fitts et al., 1982; Byrd et al., 1989; Gollnick et al., 1991; Luckin et al., 1991; Booth et al., 1997; Green et al., 1998; Williams et al., 1998; Yasuda et al., 1999; Ortenblad et al., 2000b; Matsunaga et al., 2000), 疲労を誘因する方法などが研究間で異なるため、疲労の程度とSRの機能の変化とがどのような関係

にあるのかを、先行研究に基づいて比較・検討することはできなかった。この問題について明確にするためにWard et al. (1998) は摘出したカエルの縫工筋に1回100msec (100 Hz) の電気刺激を1秒に2回 (2.0 trains per second; 2.0TPS), 0.5回 (0.5TPS) および0.2回 (0.2TPS) の3種類の頻度で、張力が初期値の約20%に低下するまで負荷するという実験を行った。そして、20%の低下にまで要した平均時間は、2.0 TPSで59秒、0.5TPSで261秒、0.2TPSで1014秒と大きく異なったが、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みおよび放出速度は、どの頻度の刺激でも同程度低下したことを観察している (Fig. 5)。彼らの結果は、収縮の活動様式が異なっても、疲労した筋ではどれもSRの機能の不全が起きていることを明示するものであり、筋疲労の要因の少なくとも一部がSRにあることが示唆される。疲労困憊まで継続すればランニングなどの日常行われる運動によっても、電気刺激の場合と同様、SRの機能が変化することが報告されており、それらをTable 2にまとめた。

### B. $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能力減少の要因

#### 1. 水素イオン濃度

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseは水素イオン濃度に対する反応性が高く、pHが7.1から6.2に変化すると、活性は60%以上も低下する (Stienen et al., 1999)。水素イオン濃度の上昇に伴ってこのような変化が生じる素因としては、リン酸化中間体 (Fig. 3) の形成速度が低減すること (Mandel et al., 1982), および $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位において $\text{Ca}^{2+}$ に対する親和性が低下すること (Inesi and Hill, 1983) の2つがあげられる。強度の高い運動を行うと筋内のpHが6.5以下に低下することがあり (Metzger and Fitts, 1987), このタイプの運動に伴ってみられる $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能の減少に、pHの変化が関与しているものと思われる。しかしながら、低pHに浸漬した後pH6.8の溶液に戻すと、迅速に $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性が回復することがMandel et al. (1982) によって示されており、pHの低下はタンパクに破壊的な打撃をもたらすわけではないことが示唆される。



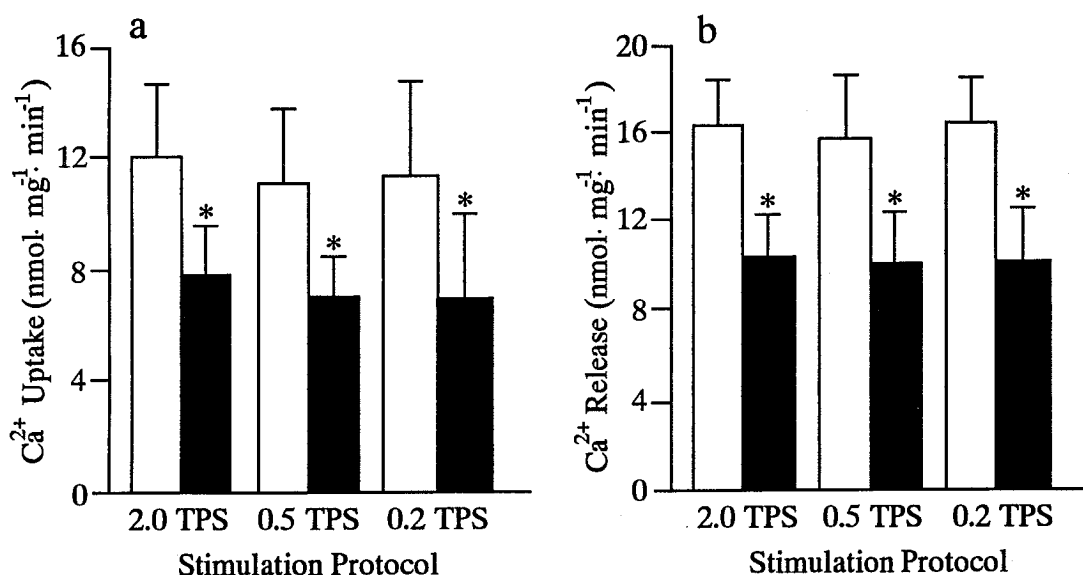


Fig. 5 Changes in rates of Ca<sup>2+</sup> uptake (a) and release (b) in control (open bars) and fatigued (solid bars) muscles. Experimental muscles were exposed to a fatigue protocol in which tetanic contractions were electrically evoked by 100-msec train (100Hz) at 2.0, 0.5 or 0.2 trains per second (TPS). Stimulation was continued until force was reduced to ~20% of initial. Values are means ± SE. \*P < 0.05 vs. control. (from Ward et al., 1998)

Table 2. Effect of exhaustive exercise on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> uptake and release rate

Reference	Type of exercise	Time to exhaustion	Species	Muscle	Ca <sup>2+</sup> -ATPase activity	Ca <sup>2+</sup> -uptake rate	Ca <sup>2+</sup> -release rate
Gollnick et al. (1991)	Kicking	2.8 min	Human	VL		42% ↓	
Byrd et al. (1989)	Running	4.56 min	Horse	MG	50% ↓	43% ↓	
Matsunaga et al. (2000)	Running	306 sec	Rat	VLS	19% ↓	16% ↓	NS
Green et al. (1998)	Cycling	60 min §	Human	VL	33% ↓		
Booth et al. (1997)	Cycling	72 min	Human	VL	21% ↓	17% ↓	
Luckin et al. (1991)	Running	105 min	Rat	GAS	40% ↓		
Favero et al. (1993)	Running	115 min	Rat	GAS			22% ↓
Inashima and Wada (unpublished)	Running	253 min	Rat	PL	22% ↓	17% ↓	NS
				SOL	43% ↓	38% ↓	25% ↓
Fitts et al. (1982)	Swimming	7h	Rat	VLD	NS	26% ↓	
				SOL	NS	NS	

§, Subjects performed continuous cycling for 30 min at 58% VO<sub>2</sub> max followed by 30 min at 72% VO<sub>2</sub> max, not to exhaustion.

Abbreviations: VL, vastus lateralis; VLD, deep region of vastus lateralis; VLS, superficial region of vastus lateralis; SOL, soleus; MG, middle gluteal; GAS, gastrocnemius; PL, plantaris; NS, no significant difference.

Ca<sup>2+</sup>-ATPaseを介さない他の経路も考えられる。Lamb et al. (1992) は、pHが低下するとSRからCa<sup>2+</sup>が流出するようになることを報告しており、筋疲労に伴うCa<sup>2+</sup>取り込み能低下に、SR膜に対するCa<sup>2+</sup>透過性の亢進が関与している可能性も否定できない。

## 2. ATP結合部位の修飾

fluorescein isothiocyanate (FITC) は、アデニンクレオチド結合部位に存在するリシン残基に特異的に結合する試薬である (Mitchinson et al., 1981)。Luckin et al. (1991) および Leberer et al. (1987) は、長時間運動を行わせた齧歯類の速筋において、SRに対するFITCの結合量が低下したことを認め、筋活動によりCa<sup>2+</sup>-ATPase活性が低下するのは、タンパクのATP結合部位が何らかの修飾を受けるためであろうと結論している。

速筋のこのような変化とは対照的に、高強度・短時間運動を行ったラットの遅筋では、ATP結合部位に対するATPの親和性は逆に亢進していることが報告されている (Inashima et al., 1998; Yasuda et al., 1999)。このような結果が得られた原因は明らかではないが、ATP結合部位がマイナスの影響を受けまいよう遅筋内の代謝環境が作用したこと、あるいはホスホランパンのCa<sup>2+</sup>-ATPase活性抑制効果が消失し、ATPの親和性が増加したように観察されたことなどがその要因として推察される。

## 3. 活性酸素種

### (1) 一酸化窒素

活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) とは、通常の酸素より反応性の高い酸素化合物の総称であり、それらの幾つかは生体成分と反応し、種々の程度の障害をもたらす。酸素は大部分の生物にとって必要不可欠なものである反面、生体内では酸素を利用する過程において、このROSが常に生成されており、活発に活動している筋細胞内では、ROSの産生量は顕著に高まることが知られている (Reid et al., 1992)。

L-アルギニンからL-シトルリンへの変換過程において合成される一酸化窒素 (nitric oxide; NO)

はROSの1つである。この過程を触媒するNO合成酵素には、neural type, inducible typeおよびendothelial typeの3種類のアイソフォームが存在し、type II線維にはneural typeが分布している (Kobzik et al., 1994)。筋収縮に伴い細胞内のNOの濃度が高まるのは (Reid, 1998)、Ca<sup>2+</sup>-カルモデュリン複合体がこの酵素を活性化するためである。NOは電気的に中性であり組織中で容易に拡散し、細胞間の伝達シグナルの役割を果たしていると考えられており、例えば、血中に放出されたNOは血管を拡張させるよう働きかける (Reid, 1998)。しかしながら、SRに対してはタンパクと反応することにより、その機能を低下させることが認められている (Wolosker et al., 1996; Ishii et al., 1998)。

ATP産生に重要な役割を担うクレアチンキナーゼ (creatine kinase; CK) は、筋原線維、ミトコンドリアあるいはSRなどの器官に結合して存在しており、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPaseはCa<sup>2+</sup>取り込みに際し、SRに結合しているCKにより、局所的に産生されるATPを主として利用していると考えられている (Rossi et al., 1990)。したがって、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPaseが修飾を受けなくても、CK活性が低下すれば基質が十分に供給されなくなり、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの機能は低減することになる。

NOがSRに対し負の影響を招来するメカニズムについては、in vitroの実験から相反する知見が報告されている。例えば、Ishii et al. (1998) および Belia et al. (1998) は、NOはCa<sup>2+</sup>-ATPaseを直接修飾することを、一方、Wolosker et al. (1996) はCa<sup>2+</sup>-ATPaseには影響しないがCK活性を低下させることを認めている。どちらのメカニズムが作用しているのかについては、現在の段階では明らかではないが、何れにせよ、SRの機能に対してマイナスに作用していることは間違いなく、生体内においても発生するNOに起因してCa<sup>2+</sup>取り込み能が抑制されている可能性がある (Matsunaga et al., 2000)。

### (2) 一酸化窒素以外の活性酸素種

In vitroの実験報告では、NO以外のROSはCa<sup>2+</sup>-ATPase活性を抑制することによって、SRのCa<sup>2+</sup>

取り込み能の低減をもたらすことが示されている (Scherer and Deamer, 1986; Favero et al., 1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase はシステイン残基26個を含んでおり、これらのうち20個が free SH 基として存在している (Hasselbach and Seraydarian, 1966). ROS による  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下は、SR の free SH 基の減少を伴うこと (Favero et al., 1998), あるいはジスルフィド結合の還元剤であるジチオトレイトールが、低下した  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を回復させる効果を有すること (Scherer and Deamer, 1986; Favero et al., 1998) などが認められており、ROS に起因する  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下は、活性触媒作用に重要な役割を担う SH 基が酸化されることによって起こるものと考えられている。Favero et al. (1998) は、SR を ROS へ暴露すると、free SH 基の減少に加え SR に対する FITC の結合量が低下したことを認めており、前述の ATP 結合部位の修飾に ROS が関与している可能性がある。

$\text{Ca}^{2+}$  取り込みの場合とは逆に、ROS の持つ酸化作用は  $\text{Ca}^{2+}$  放出に対しては促進的に働くことが知られている (Favero, et al., 1995)。これは RyR を構成する SH 基が酸化されると、チャンネルが開になるためであるが、この事実から Reid et al. (1992) は、興奮・収縮連関が正常に機能するためには、ROS の存在が必須であろうと述べている。

#### 4. $\text{Ca}^{2+}$ 濃度

筋線維を長時間収縮させると、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が通常より高く保たれた状態が継続されるが (Allen et al., 1989; Carrol et al., 1999), この変化によって幾つかの器官が甚大な損傷を受けることが知られている (Duncan, 1987)。例えば、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼであるカルパインが  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって活性化されると、筋原線維タンパク (Z 線, トロポニン T・I, トロポミオシン) や細胞骨格タンパク (ビメンチン, デスミン,  $\alpha$ -アクチニン) などが分解される (Reddy et al., 1975)。また、アクチン結合タンパクであり、細胞質の硬度を調節する役割を担うゲルゾリンは、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高まるとアクチン線維を切断する作用を持つようになる (Yim, 1987)。 $\text{Ca}^{2+}$  が SR に及ぼ

す影響については、 $50 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  に15秒間 SR を暴露すると SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流出が起こることが Lamb and Cellini (1999) によって報告されており、運動による  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能の低下に、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇も関与していることが考えられる。

### C. $\text{Ca}^{2+}$ 放出能力減少の要因

#### 1. ATP

電気刺激により強縮を繰り返し張力が低下しつつある筋線維を用いた、Allen et al. (1997) の報告は興味深い。彼らは強い光を照射すると ATP を遊離する化合物である caged ATP を利用し、細胞内の ATP の濃度を一瞬のうちに高めると (Fig. 6A), 収縮時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度および張力が増加することを観察しており (Fig. 6B), ATP の濃度の低下が  $\text{Ca}^{2+}$  放出能減少の成因であることが示唆される。DHPR および RyR はリン酸化部位を持っており (Melzer et al., 1995), 三つ組み構造付近に局在する ATP の分解によってこれらの部位がリン酸化されることが、T 管から RyR への正常なシグナル伝達にとって重要であろうことは、Westerblad et al. (1998) が指摘する通りである。ATP 濃度の低下により、この部位の機能に不全が生じたものと推測される。

#### 2. グリコーゲン

筋内のグリコーゲン濃度が低下すると、発揮される張力および  $\text{Ca}^{2+}$  放出能が低下することが明らかになっているが (Chin and Allen, 1997), この現象は前述の ATP の影響を介したものである。しかしながら、疲労困憊運動直後でも、筋内の ATP の濃度は  $3.4\text{mM}$  程度にまでしか低下していない。この値は ATPase の  $K_m$  よりはるかに高く (Leberer et al., 1987),  $\text{Ca}^{2+}$  放出能の減少が ATP 濃度の低下に原因して起こるとする知見と一見矛盾する。

SR や三つ組み構造の部位には解糖系酵素が局在し (Enteman et al., 1980; Brandt et al., 1990), DHPR と RyR 間のシグナル伝達に必要とされる ATP は、これらが SR の膜に結合しているグリコーゲンを分解し、局所的に産生するものが用いら

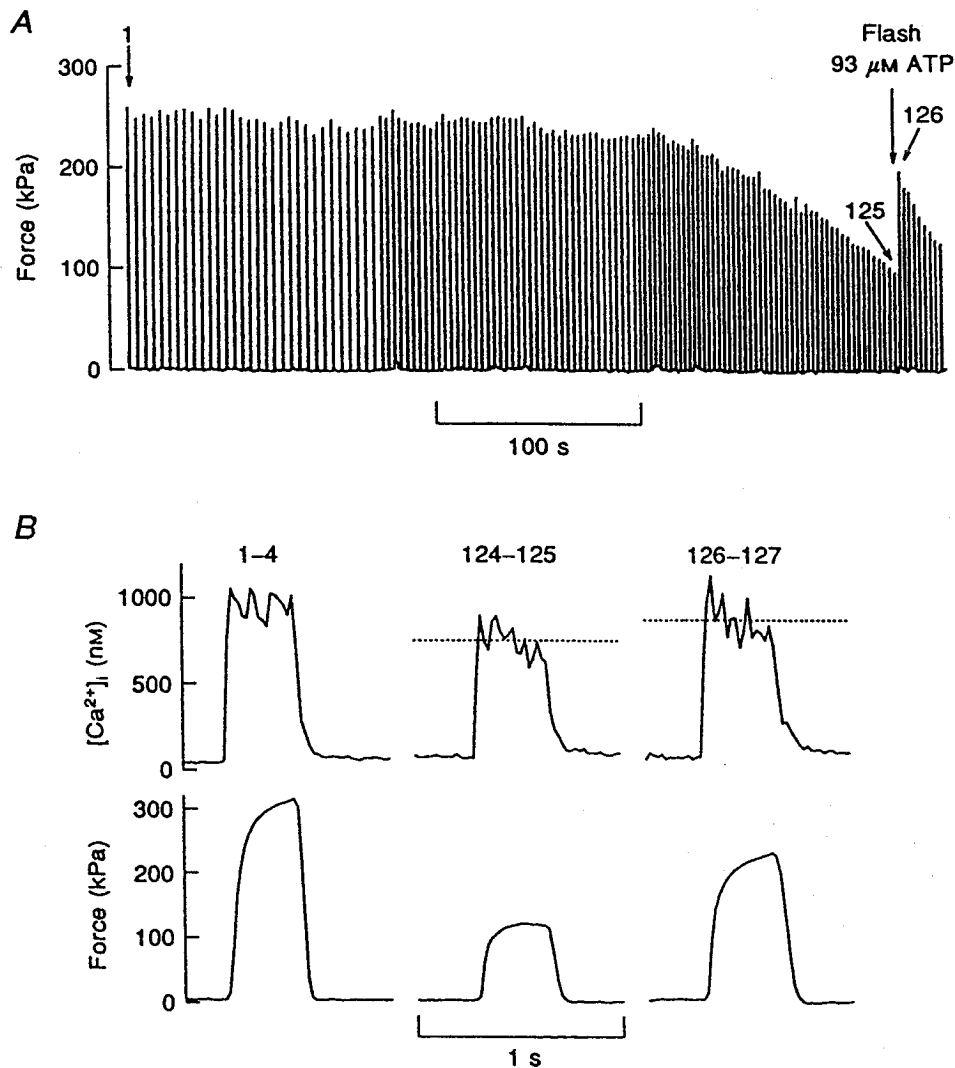


Fig. 6 Effect of photolytic release of ATP during the final phase of fatiguing stimulation.

A, continuous force record of a fatigue run. The ATP concentration was increased when the force was reduced to about 40% between tetanus 125 and 126. B, selected and averaged free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and force signals from numbered tetani: left, tetani 1-4 of the fatigue run; center, last two tetani before increased ATP concentration (124-125); right, first two tetani after increased ATP concentration (126-127). (from Allen et al., 1997)

れていると考えられている。したがって、全筋レベルではATPの濃度の低下は顕著ではないが、グリコーゲンが枯渇した部位では、局所的にATPの濃度は大きく低下しているものと推測される (Westerblad et al., 1998)。

### 3. 無機リン酸 (Pi)

安静時では筋細胞内のPiの濃度は、type I線維

で6mM以下、type II線維で1mM以下であるが、高強度運動後では30~40mMに増加する (Cady et al., 1989)。Piの濃度が高まると、筋原線維では $\text{Ca}^{2+}$ に対する感受性やミオシンATPase活性の低下などが起こる (Godt and Nosek, 1989; Stienen et al., 1999)。このために筋が発揮する張力が低下するが、張力低下の成因は筋原線維の機能の不全だけではなく、SRの $\text{Ca}^{2+}$ 放出能が低下することに

もある。

Ca<sup>2+</sup>放出の低下はPiの濃度が比較的低い場合でもみられ、Piの濃度が10mMで12%、20mMで29%低下することが、Posterino and Fryer (1998)によって報告されている。PiがCa<sup>2+</sup>放出にマイナスに作用するメカニズムは、次のように考えられている。筋形質中のPiの濃度が高まると、PiはSR内腔へと入り込み、そこに豊富に存在するCa<sup>2+</sup>と結合し、沈殿物を形成する。Ca<sup>2+</sup>-カルセクエストリン複合体と比べると、PiはCa<sup>2+</sup>と強く結合しているため、この沈殿物に含まれるCa<sup>2+</sup>は放出に利用されにくく、そのためにCa<sup>2+</sup>放出が低下するというのである。SRには、ATP依存性のPiトランスポーターが存在することが示されており (Fryer et al., 1997)、このトランスポーターが、PiがSRに流入する経路の1つであると考えられている。

## VI. おわりに

Stienen et al. (1999) は、Piの濃度の増加とpHの低下のどちらもCa<sup>2+</sup>-ATPase活性を低下させるが、両方を同時に負荷すると、各々の低下率の合計を上回る減少がみられたことを認めている。彼らの報告は、収縮中に起こる複数の変化の相互作用により、SRへの影響が強化されたり、あるいは緩和されたりする場合があること示唆するものであるが、このような視点からの研究は彼ら以外ではみうけられない。トレーニングの影響については、顕著な変化が起こるのか否か、また起こるとすればどのようなメカニズムが作用しているのか明確にはなっておらず、今後これらの点について研究を行う必要がある。

## 文 献

Adams, B. A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S., and Beam, K. G. (1990) Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* 346: 569-572.

Allen, D. G., Lannergren, J., and Westerblad, H. (1997) The role of ATP in the regulation of intra-

cellular Ca<sup>2+</sup> release in single fibres of mouse skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 498: 587-600.

Allen, D. G., Lee, J. A., and Westerblad, H. (1989) Intracellular calcium and tension during fatigue in isolated single muscle fibers from *Xenopus laevis*. *J. Physiol. (Lond.)* 415: 433-458.

Alway, S. E., MacDougall, J. D., Sale, D. G., Sutton, J. R., and McComas, A. J. (1988) Functional and structural adaptations in skeletal muscle of trained athletes. *J. Appl. Physiol.* 64: 1114-1120.

Barnard, R. J., Edgerton, V. R., and Peter, J. B. (1970) Effect of exercise on skeletal muscle I. Biochemical and histochemical properties. *J. Appl. Physiol.* 28: 762-766.

Belcastro, A. N. (1987) Myofibril and sarcoplasmic reticulum changes during muscle development: activity vs. inactivity. *Int. J. Biochem.* 19: 945-948.

Belia, S., Pietrangelo, T., Fulle, S., Menchetti, G., Cecchini, E., Felaco, M., Vecchiet, J., and Fano, G. (1998) Sodium nitroprusside, a NO donor, modifies Ca<sup>2+</sup> transport and mechanical properties in frog skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19: 865-876.

Booth, J., McKenna, M. J., Ruell, P. A., Gwinn, T. H., Davis, G. M., Thompson, M. W., Harmer, A. R., Hunter, S. K., and Sutton, J. R. (1997) Impaired calcium pump function does not slow relaxation in human skeletal muscle after prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* 83: 511-521.

Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R., and MacLennan, D. H. (1987) Adult forms of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 3768-3774.

Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B., and MacLennan, D. H. (1986) Two Ca<sup>2+</sup>-ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44: 597-607.

Brandt, N. R., Caswell, A. H., Wen, S.-R., and Talvenheimo, J. A. (1990) Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Memb. Biol.* 113: 237-251.

Burk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D. H., and Shull, G. E. (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar

- Ca<sup>2+</sup> pump. *J. Biol. Chem.* 264: 18561-18568.
- Byrd, S. K., McCutcheon, L. J., Hodgson, D. R., and Gollnick, P. D. (1989) Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* 67: 2072-2077.
- Cady, E. B., Jones, D. A., Lynn, J., and Newham, D. J. (1989) Changes in force and intracellular metabolites during fatigue of human skeletal muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 418: 311-325.
- Carrol, S., Nicotera, P., and Pette, D. (1999) Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am. J. Physiol.* 277: C1122-C1129.
- Chin, E. R. and Allen, D. G. (1997) Effects of reduced muscle glycogen concentration on force, Ca<sup>2+</sup> release and contractile protein function in intact mouse skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 497: 17-29.
- Damiani, E. and Margreth, A. (1990) Specific protein-protein interaction of calsequestrin with junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 1253-1259.
- Davey, D. F. and Wong, S. Y. P. (1980) Morphometric analysis of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58: 213-230.
- Duncan, C. J. (1987) Role of calcium in triggering rapid ultrastructural damage in muscle: a study with chemically skinned fibres. *J. Cell Sci.* 87: 581-594.
- Dux, L. (1993) Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 122: 70-147.
- Endo, M., Tanaka, M., and Ogawa, Y. (1970) Calcium induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228: 34-36.
- Enteman, M., Keslensky, S., Chu, A., and van Winkle, B. (1980) The sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex in mammalian fast twitch skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 255: 6245-6252.
- Favero, T. G. (1999) Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 87: 471-483.
- Favero, T. G., Colter, D., Hooper, P. F., and Abramson, J. J. (1998) Hypochlorous acid inhibits Ca<sup>2+</sup>-ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.* 84: 425-430.
- Favero, T. G., Pessah, I. N., and Klug, G. A. (1993) Prolonged exercise reduces Ca<sup>2+</sup> release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch.* 422: 472-475.
- Favero, T. G., Zable, A. C., and Abramson, J. J. (1995) Hydrogen peroxide stimulates the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 25557-25563.
- Fitts, R. H. (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol. Rev.* 74: 49-74.
- Fitts, R. H., Courtright, J. B., Kim, D. H., and Witzmann, F. A. (1982) Muscle fatigue with prolonged exercise: contractile and biochemical alterations. *Am. J. Physiol.* 242: C65-C73.
- Fleischer, S., Ogunbunmi, E., Dixon, M., and Fleer, E. (1985) Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7256-7259.
- Fryer, M. W., West, J. M., and Stephenson, D. G. (1997) Phosphate transport into the sarcoplasmic reticulum of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18: 161-167.
- Godt, R. E. and Nosek, T. M. (1989) Changes of intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 412: 155-180.
- Gollnick, P. D., Korge, P., Karpakka, J., and Saltin, B. (1991) Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiol. Scand.* 142: 135-136.
- Green, H. J., Grange, F., Chin, C., Goreham, C., and Ranney, D. (1998) Exercise-induced decrease in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity attenuated by high-resistant training. *Acta Physiol. Scand.* 164: 141-146.
- Green, H. J., Grange, F., Goreham, C., Shoemaker, K., and Grant, S. (1995) Failure of high resistance and submaximal exercise training to alter sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in human muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27: S66.
- Green, H. J., Klug, G. A., Reichmann, H., Seedorf, U., Wiehrer, W., and Pette, D. (1984) Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum

- in muscles of the rat. *Pflügers Arch.* 400: 432-438.
- Gundersen, K., Leberer, E., Lømo, T., Pette, D., and Staron, R. S. (1988) Fibre types, calcium-sequestering protein and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of rat. *J. Physiol. (Lond.)* 398: 177-189.
- Hasselbach, W. and Seraydarian, K. (1966) The role of sulfhydryl groups in calcium transport through the sarcoplasmic membranes of skeletal muscle. *Biochem. Z.* 345: 159-172.
- Hymel, L., Inui, M., Fleischer, S., and Schindler, H. (1988) Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms  $\text{Ca}^{2+}$ -activated oligomeric  $\text{Ca}^{2+}$  channels in planar bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 441-445.
- Inashima, S., Yasuda, T., Inamizu, A., Wada, M., and Katsuta, S. (1998) Effects of exhaustive exercise on sarcoplasmic reticulum ATPase: comparison of short- and long-term exercise. *Jpn. J. Phys. Fit. Sports Med.* 47: 63-72.
- Inesi, G. and Hill, T. L. (1983) Calcium and proton dependence of sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 44: 271-280.
- Inui, M., Saito, A., and Fleischer, S. (1987) Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J. Biol. Chem.* 262: 15637-15642.
- Ishii, T., Sunami, O., Saitoh, N., Nishio, H., Takeuchi, T., and Hata, F. (1998) Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by nitric oxide. *FEBS Lett.* 440: 218-222.
- Jakab, G. Y. and Kranias, E. G. (1988) Phosphorylation and dephosphorylation of phospholamban and associated phosphatidylinositides. *Biochemistry* 27: 3799-3806.
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M., and Carafoli, E. (1989) Nature and site of phospholamban regulation of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342: 90-92.
- Jorgensen, A. O. and Jones, L. R. (1986) Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 261: 3775-3781.
- Kim, D. H., Wible, G. S., Witzmann, F. A., and Fitts, R. H. (1981) The effect of exercise-training on sarcoplasmic reticulum function in fast and slow skeletal muscle. *Life Sci.* 28: 2671-2677.
- Klitgaard, H., Ausoni, S., and Damiani, E. (1989) Sarcoplasmic reticulum of human skeletal muscle: age-related changes and effect of training. *Acta Physiol. Scand.* 137: 23-31.
- Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S., and Stamler, J. S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548.
- Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., and Liu, Q. Y. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331: 315-319.
- Lamb, G. D. and Cellini, M. A. (1999) High intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 519: 815-827.
- Lamb, G. D., Recupero, E., and Stephenson, D. G. (1992) Effect of myoplasmic pH on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of the toad. *J. Physiol. (Lond.)* 448: 211-224.
- Larsson, L., Edstrom, L., Lindegren, B., Gorza, L., and Schiaffino, S. (1991) MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.* 261: C93-C101.
- Leberer, E., Härtner, K.-T., Brandl, C. J., Fujii, J., Tada, M., MacLennan, D. H., and Pette, D. (1989) Slow/cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and phospholamban mRNAs are expressed in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* 185: 51-54.
- Leberer, E., H.-T. Härtner, K.-T., and Pette, D. (1987) Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* 162: 555-561.
- Leberer, E. and Pette, D. (1986) Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase, calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur. J. Biochem.* 156: 489-496.
- LePeuch, C. J. and Demaille, J. G. (1989) Covalent regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* 10: 397-400.
- Luckin, K. A., Favero, T. G., and Klug, G. A. (1991) Prolonged exercise induces structural changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 46: 391-405.

- Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M., and MacLennan, D. H. (1989) Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco (endo) plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 364: 7059-7065.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., and Green, N. M. (1985) Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316: 696-700.
- Madsen, K., Franch, J., and Clausen, T. (1994) Effects of intensified endurance training on the concentration of Na, K-ATPase and Ca-ATPase in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 150: 251-258.
- Mandel, F., Kranias, E. G., DeGende, A. C., Sumida, M., and Schwartz, A. (1982) 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.* 50: 310-317.
- Marey, E. J. (1868) Du mouvement dans les fonctions de la vie. cit. in: Mosso, A (15)
- Matsunaga, S., Tsuchimochi, H., Inashima, S., Hazama, T., Nihata, S., and Wada, M. (2000) Alterations in function of sarcoplasmic reticulum after acute high-intensity exercise. *Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med.* 49: 139-148.
- Meissner, G. (1986) Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306.
- Melzer, W., Herrmann-Frank, A., and Luttgau, H. (1995) The role of  $\text{Ca}^{2+}$  ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta* 1241: 59-116.
- Metzger, J. M. and Fitts, R. H. (1987) Role of intracellular pH in muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 62: 1392-1397.
- Mitchinson, C., Wolderson, A., Trinnaman, B., and Green, M. (1981) Identification of a labeled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate. *FEBS Lett.* 123: 127-130.
- Oetliker, H. (1982) An appraisal of the evidence for a sarcoplasmic reticulum membrane potential and its relation to calcium release in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 3: 247-272.
- Ohlendieck, K., Briggs, F. N., Lee, K. F., Wechsler, A. W., and Campbell, K. P. (1991) Analysis of excitation-contraction-coupling components in chronically stimulated canine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 202: 739-747.
- Ortenblad, N., Lunde, P. K., Levin, K., Andersen, J. L., and Pedersen, P. K. (2000a) Enhanced sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release following intermittent sprint training. *Am. J. Physiol.* 279: R152-R160.
- Ortenblad, N., Sjogaard, G., and Madsen, K. (2000b) Impaired sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release rate after stimulation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 89: 210-217.
- Pette, D. (1992) Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle. *J. Heart Lung transplant.* 11: S299-S305.
- Pette, D., Peuker, H., and Staron, R. S. (1999) The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol. Scand.* 166: 261-277.
- Peuker, H., Conjard, A., and Pette, D. (1998)  $\alpha$ -Cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHCIIa and MHCI  $\beta$  in transforming rabbit muscle. *Am. J. Physiol.* 274: C595-C602.
- Posterino, G. S. and Fryer, M. W. (1998) Mechanism underlying phosphate-induced failure of  $\text{Ca}^{2+}$  release in single skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 512: 97-108.
- Powell, J. A. and Fambrough, D. M. (1973) Electrical properties of normal and dysgenic mouse skeletal muscle in culture. *J. Cell Physiol.* 82: 21-38.
- Reddy, M. K., Etlenger, J. D., Rabinowitz, M., Fischman, D. A., and Zak, R. (1975) Removal of Z-lines and alpha-actinin from isolated myofibrils by a calcium-activated neutral protease. *J. Biol. Chem.* 250: 4278-4284.
- Reid, M. B. (1998) Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol. Scand.* 162: 401-409.
- Reid, M. B., Haack, K. E., Franchek, K. M., Valberg, P. A., Kobzik, L., and West, M. S. (1992) Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and muscle fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* 73: 1797-1804.
- Rossi, A. M., Eppenberger, H. M., Volpe, P., Cotrufo, R., and Wallimann, T. (1990) Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and regu-



- late local ATP/ADP ratios. *J. Biol. Chem.* 265: 5258-5266.
- Rüegg, J. C. (1988) Calcium in muscle activation. Springer-Verlag: Berlin, pp1-300.
- Saborido, A., Molano, F., Moro, G., and Megias, A. (1995) Regulation of dihydropyridine receptor levels in skeletal and cardiac muscle by exercise training. *Pflügers Arch.* 429: 364-369.
- Scherer, N. M. and Deamer, D. W. (1986) Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 589-601.
- Stienen, G. J., Papp, Z., and Zaremba, R. (1999) Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned fibres of *Xenopus laevis*. *J. Physiol. (Lond.)* 518: 735-744.
- 鈴木裕 (1998)  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ—形質膜と小胞体—タンパク質, 核酸, 酵素 43: 1610-1621.
- Takekura, H., Bennett, L., Tanabe, T., and Beam, K. G. (1994) Restoration of junctional tetrads in dystrophic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys. J.* 67: 793-803.
- Takehima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsui, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., and Numa, S. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
- Wada, M. and Tsuchimochi, H. (1996) Dysfunction of sarcoplasmic reticulum by exercise. *Jpn. J. Sports Sci.* 15: 279-285.
- Ward, C. W., Spangenburg, E. E., Diss, L. M., and Williams, J. H. (1998) Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum uptake and release. *Am. J. Physiol.* 275: R99-R104.
- Westerblad, H., Allen, D. G., Bruton, J. D., Andrade, F. H., and Lannergren, J. (1998) Mechanisms underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol. Scand.* 162: 253-260.
- Williams, J. H. and Klug, G. A. (1995) Calcium exchange hypothesis of skeletal muscle fatigue: a brief review. *Muscle Nerve* 18: 421-434.
- Williams, J. H., Ward, C. W., Spangenburg, E. E., and Nelson, R. M. (1998) Functional aspects of skeletal muscle contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum after fatigue. *J. Appl. Physiol.* 85: 619-629.
- Wolosker, H., Panizzutti, R., and Engelender, S. (1996) Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.* 392: 274-276.
- Wu, K. D., Lee, W. S., Wey, J., Bungard, D., and Lytton, J. (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* 269: C775-C784.
- Yamada, S. and Tonomura, Y. (1972) Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATP-ase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. VII. Recognition and release of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *J. Biochem.* 72: 417-425.
- 山本啓一・丸山工作 (1986) 筋肉. 化学同人: 京都, pp.1-124.
- Yasuda, T., Inashima, S., Sasaki, S., Kikuchi, K., Niihata, S., Wada, M., and Katsuta, S. (1999) Effects of exhaustive exercise on biochemical characteristics of sarcoplasmic reticulum from rat soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.* 165: 45-50.
- Yim, H. L. (1987) Gelsolin: calcium and polyphosphoinositide-regulated actin modulating protein. *Bioassays* 7: 176-179.

(平成12年11月24日受付)  
(平成13年5月28日受理)