

博士論文

収縮活動に伴う筋小胞体の機能変化の要因

平成 19 年 9 月

三島 隆章

目 次

I 章 緒言	1
II 章 文献研究	3
1. 筋小胞体の構造	3
2. Ca^{2+} 放出の仕組み	4
A. デイヒドロピリジン受容体	4
B. リアノジン受容体	7
3. Ca^{2+} の取り込みに関与するタンパクとその機能	7
4. 遅筋線維と速筋線維の筋小胞体の特徴	8
5. 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化	10
6. 収縮活動後の回復期における筋小胞体の機能の経時的変化	11
7. 筋小胞体による Ca^{2+} 取り込み能力減少の要因	12
A. 水素イオン濃度	12
B. 無機リン酸	12
C. ATP 結合部位の修飾	13
D. 活性酸素種	13
E. 筋グリコーゲン	13
8. 筋小胞体による Ca^{2+} 放出能力減少の要因	14
A. 無機リン酸	14
B. 活性酸素種	15
III 章 研究の目的および課題	16
IV 章 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 1)	18
1. 目的	18
2. 方法	19
A. 被検動物および実験プロトコール	19
B. 被検筋および筋タンパクの抽出	20
C. 分析項目	20
c-1. 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度	20
c-2. SR Ca^{2+} 取り込み速度および放出速度の測定	21
c-3. SR Ca^{2+} -ATPase 活性の測定	22
D. 統計処理	23

3. 結果	23
A. 張力の変化	23
B. 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度	23
C. SR Ca ²⁺ 取り込み速度	24
D. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性	24
E. SR Ca ²⁺ 放出速度	25
4. 考察	31
5. 要約	33

V章 収縮活動後の回復期における

筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 2) 35

1. 目的	35
2. 方法	36
A. 被検動物および実験プロトコール	36
B. 分析項目	36
C. 統計処理	37
3. 結果	37
A. 張力-頻度特性	37
B. SR Ca ²⁺ 取り込み速度	38
C. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性	38
D. SR Ca ²⁺ 放出速度	38
4. 考察	43
5. 要約	45

VI章 収縮活動後の回復期における

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase 活性の変化の要因 (実験 3) 47

1. 目的	47
2. 方法	47
A. 被検動物および実験プロトコール	48
B. 被検筋, 筋タンパクの抽出およびSRの精製	48
C. 分析項目	49
c-1. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性	49
c-2. グリコーゲンフォスホリラーゼ含有量	49
c-3. カルボニル量	49
c-4. SRに付着するグリコーゲン量	50
c-5. FITC 結合量	50

D. 統計処理	51
3. 結果	51
A. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性	51
B. カルボニル量および FITC 量	51
C. グリコーゲンフォスホリラーゼおよびグリコーゲン量	52
4. 考察	58
5. 要約	59

VII章 グリコーゲンの減少が筋小胞体 Ca²⁺-ATPase 活性の

機能およびその構造に及ぼす影響 (実験 4)..... 61

1. 目的	61
2. 方法	62
A. 被検動物	62
B. 被検筋および SR の精製	62
C. 分析項目	62
c-1. SR グリコーゲン量	62
c-2. SR Ca ²⁺ -ATPase および グリコーゲンフォスホリラーゼ含有量	63
c-3. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性	63
c-4. FITC 結合量	63
D. 統計処理	63
3. 結果	63
A. SR グリコーゲン量	63
B. SR Ca ²⁺ -ATPase および グリコーゲンフォスホリラーゼ含有量	64
C. FITC 結合量	64
D. SR Ca ²⁺ -ATPase 活性および ATP に対する親和性	64
4. 考察	69
5. 要約	70

VIII章 討論

72

IX章 総括

77

X章 結論	82
謝辞	83
文献	84
参考論文.....	95

List of tables

Table 1. Concentrations of glycogen and lactate in different muscles.

List of figures

- Fig. 1. Sarcometric array of membrane system in skeletal muscle fiber.
- Fig. 2. A diagrammatic representation of the major components of a muscle cell involved in excitation-contraction coupling.
- Fig. 3. The reaction cycle of sarcoplasmic reticulum calcium pump.
- Fig. 4. Force output during tetanic contraction (a) and original force records from typical fatigue runs (b).
- Fig. 5. Changes in Ca^{2+} uptake rates of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 6. Changes in Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 7. Changes in Ca^{2+} release rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 8. Peak twitch and tetanic tension in gastrocnemius at different frequencies immediately (■), 5 min (▨), 10 min (▩), 30 min (▧) and 60 min (□) after fatiguing contraction.
- Fig. 9. Fatiguing contraction-induced changes in Ca^{2+} uptake rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 10. Fatiguing contraction-induced changes in Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at

different time points.

- Fig. 11. Fatiguing contraction-induced changes in Ca^{2+} release rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) leg and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 12. Fatiguing contraction-induced changes in Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 13. Densitometric evaluation of anti-2, 4, 4-dinitrophenylhydrazine - reactive carbonyl groups of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 14. Densitometric evaluation of FITC binding to sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 15. Densitometric evaluation of glycogen phosphorylase (GP) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 16. Glycogen concentration associated with sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points.
- Fig. 17. Glycogen concentration associated with sarcoplasmic reticulum (SR) for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions.
- Fig. 18. Electrophoretic separation of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum (SR) and glycogen phosphorylase (GP) (a) and their contents (b) in microsomal fractions for control (*solid bars*) and glycogen-extracted (*open bars*) conditions.
- Fig. 19. Electrophoretic of FITC-labeled sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase(a) and densitometric evaluation of FITC binding (b) for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions.

Fig. 20. Ca^{2+} -ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) and ATP dependence of SR Ca^{2+} -ATPase for control (*solid bars*) and glycogen-extracted (*open bars*) conditions.

略語と記号

本論文で用いる略語と記号は以下の通りである。

ADP	: adenosine diphosphate アデノシン二リン酸
ATP	: adenosine triphosphate アデノシン三リン酸
ATPase	: adenosine triphosphatase アデノシントリホスファターゼ
Ca ²⁺	: カルシウムイオン
[Ca ²⁺]	: カルシウムイオン濃度
[Ca ²⁺] _f	: 遊離カルシウムイオン濃度
cAMP	: cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate サイクリックアデノシン一リン酸
Cont	: control
CSPD	: disodium 3- (4-methoxy Spiro (1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan) -4-yl) phenyl phosphate
DTT	: dithiothreitol ジチオトレイトール
DHPR	: dihydropyridine receptor デイヒドロピリジン受容体
EDTA	: ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸 金属のキレート剤
EGTA	: ethyleneglycol bis (2-aminoethyl ether) -tetraacetic acid エチレングリコールビス(2-アミノエチルエーテル)四酢酸 金属のキレート剤
Exp	: experimental

FITC	: fluorescein isothiocyanate
GA	: glucoamylase グルコアミラーゼ
GD	: the deep region of gastrocnemius 腓腹筋深層部
GP	: glycogen phosphorylase グリコーゲンフォスホリラーゼ
GS	: the superficial region of gastrocnemius 腓腹筋表層部
HEPES	: N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]緩衝液試薬の一つ。有効 pH 範囲 6.8~8.2
kDa	: キロダルトン
LFF	: low-frequency fatigue 低頻度疲労
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	: ナトリウムイオン・カリウムイオン依存性 ATPase
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide ニコチンアミドアデニンヌクレオチド
NADH	: nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form 還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド
NADPH	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form 還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸
PMSF	: phenylmethylsulfonylfluoride フェニルメタンスルホニルフルオリド セリンプロテアーゼに対する阻害剤
Pi	: inorganic phosphate 無機リン酸
ROS	: reactive oxygen species 活性酸素種
RyR	: ryanodine receptor リアノジン受容体
SERCA	: sarco(endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase

SDS	: sodium dodecylsulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis	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
SH 基	: sulfhydryl group	スルフヒドリル基、メルカプト基、チオール基などともいう
SOL	: soleus	ヒラメ筋
SR	: sarcoplasmic reticulum	筋小胞体
SR Ca ²⁺ -ATPase	: SR の膜上に存在する Ca ²⁺ 依存性 ATPase	
Stim	: stimulated	
T 管	: transverse tubule	横行小管
TBQ	: 2,5-di (tert-butyl) -1,4-benzohydroquinone	SR Ca ²⁺ -ATPase の阻害剤
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	テトラメチルエチレンジアミン
type I 線維	:遅筋線維	
type II 線維	:速筋線維	

本論文は以下に示す原著論文, および投稿審査中の原著論文に未発表の実験結果を加えてまとめたものである.

Mishima, T., Sugiyama, M., Yamada, T., Sakamoto, M. and Wada M. (2006) Effects of reduced glycogen on structure and *in vitro* function of rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Eur. J. Physiol.* 452: 117-123.

Mishima, T., Yamada, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M., Matsunaga, S. and Wada, M. Time course of changes in *in vitro* sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling and Na^{+} - K^{+} -ATPase activity during repetitive contractions.
(*Eur. J. Physiol.*へ投稿, 審査中)

I 章 緒 言

継続的な筋活動において、筋が発揮する最大張力もしくは最大パワーが低下する現象、あるいは一定の張力もしくは一定のパワーを継続して発揮できなくなる現象は、一般に「筋疲労」と呼ばれる。筋疲労に関する研究は古くからなされてきたが、そのメカニズムは明確になるどころか、近年むしろ混沌としてきたように思える。例えば、高強度運動では、産生される乳酸に起因して起こるアシドーシスが主要な要因のひとつであると考えられてきたが (Fitts and Holloszy 1976, Karlsson and Saltin 1970), 生体内に近い温度下では、アシドーシスは筋の機能にほとんど影響を及ぼさないとする知見が近時報告されている (Westerblad et al. 2002)。

筋原線維の収縮・弛緩は、筋形質内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度によって制御されている。通常、 Ca^{2+} は袋状膜構造をなす筋小胞体 (SR) の内腔に蓄積されているが、神経からの刺激が SR に達すると、 Ca^{2+} は SR 内腔から筋形質へと放出され、筋原線維の収縮を誘起する。筋形質に放出された Ca^{2+} が SR の膜上に存在する Ca^{2+} 依存性 ATPase (SR Ca^{2+} -ATPase) によって再び SR 内腔へと取り込まれると、筋原線維は弛緩する。このように、SR は筋の活動において重要な役割を果たしている器官のひとつである。近年、高強度運動を行い疲労した筋では、多くの場合、SR の Ca^{2+} 取り込み・放出能力が低下していることが示され (Hill et al. 2001, Li et al. 2002, Matsunaga et al. 2003, 2007), SR の機能の低下が筋疲労を招く要因のひとつとして注目されるようになってきた。

これまで、SR の機能不全に関与する要因として、無機リン酸 (Pi) (Dutka et al. 2005, Fryer et al. 1995) や ADP の蓄積 (Macdonald and Stephenson 2006) などに代表される代謝的因子の影響があげられてきた。ただし、in vitro で SR の機能を測定する場

合、通常、安静時の細胞内環境に近い溶液中で測定が行われ、生体内で起こる代謝的変化の影響は除去されることになる。したがって、*in vitro* の測定で観察される SR の機能変化には、代謝的因子ではなく、 Ca^{2+} の調節機能を担うタンパクの構造的変化が関与していると考えられている。

収縮活動に伴って、SR のタンパクに構造的な変化が生ずる原因としては、活性酸素種 (ROS) によるタンパクの酸化 (Matsunaga et al. 2003)、グリコーゲンの SR 膜からの解離 (Lees et al. 2001)、ATP 結合部位の修飾 (Luckin et al. 1991) などがあげられてきた。しかしながら、これらの因子の関与を示唆するいずれの報告も、収縮開始後のある一時期における筋の変化を検討したものである。したがって、SR の機能と構造的変化を示す指標とが、みかけ上同期して変化したにすぎない可能性が残されている。もし、SR の機能低下に上記の要因が直接関与しているならば、筋疲労に到る過程あるいは筋疲労からの回復過程においても、SR の機能変化とこれらの要因は並行して変化するはずである。しかしながら、これまでこのような検討はなされていない。そこで本研究では、SR Ca^{2+} -ATPase の構造に影響を及ぼすとされてきた要因の経時的変化を活性が変化する期間に測定し、それらが SR Ca^{2+} -ATPase の機能に及ぼす影響を検討することを目的とした。

II章 文献研究

1. 筋小胞体の構造

SRは筋原線維を取り囲むように発達しており (Fig. 1), 両端の膨らんだ部分を終末槽 (terminal cisternae), 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形づくられている器官を横行小 (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質内の Ca^{2+} 濃度の制御であり, 大部分の Ca^{2+} は通常SRの膜内に貯蔵されているため, 筋形質内の Ca^{2+} 濃度は $0.1 \mu\text{M}$ 以下に保たれている. Ca^{2+} の貯蔵, 放出, 取り込みの3つの機能を遂行するために, SRの膜や内腔には数種類のタンパクが存在しており, それらの中で主なものとしては, リアノジン受容体 (RyR), SRの膜上に存在する SR Ca^{2+} -ATPase, カルセクエストリンなどがあげられる (Fig. 2).

SR内腔の終末槽に局在するカルセクエストリンは Ca^{2+} 結合タンパクであり (Damiani and Margreth 1990), 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. 終末槽上のT管側に位置するRyRは Ca^{2+} 放出チャネルとして作用し, T管からの刺激に応じて Ca^{2+} を筋形質へ放出する. また, SR Ca^{2+} -ATPaseは縦走管上に点在し, 筋形質からSR内腔へ Ca^{2+} を能動的輸送する Ca^{2+} ポンプの役割を果たしている. SR Ca^{2+} -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).

2. Ca^{2+} の放出の仕組み

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Ca²⁺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15 nm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るにもかかわらず、現在に到っても明確なメカニズムは明らかにされていない。しかしながら、シグナル伝達にはT管に存在するディヒドロピリジン受容体(DHPR)とCa²⁺放出チャネルという2つの器官が中心的な役割を果たしていることが明らかとなっている。

A. ディヒドロピリジン受容体

T管に存在するDHPRは、筋細胞外部のCa²⁺を内部へと取り込むCa²⁺チャネルとしても機能しているが、骨格筋におけるこの器官の最も重要な機能は、電位センサーとしてT管の脱分極を感知し、そのシグナルをSRへと伝えることである(Fig. 2)。シグナルがSRに伝達されるメカニズムは完全には解明されていないが、DHPRの一部がリン酸化されることが、シグナル伝達に必須であることが認められている。

DHPRは、 $\alpha 1$ (分子量 170 kDa)、 $\alpha 2$ (175 kDa)、 β (52 kDa)、 γ (175 kDa)、 δ (32 kDa) の5つのサブユニットから構成されており、 $\alpha 1$ が遺伝的に欠損しているとDHPRの機能に障害が起こること (Powell and Fambrough 1973, Adams et al. 1990)、また $\alpha 1$ と β はリン酸化されやすい特性を持つことから (Favero 1999)、これら2つのサブユニットがシグナル伝達に重要な役割を持つと考えられている (Westerblad et al. 1998)。

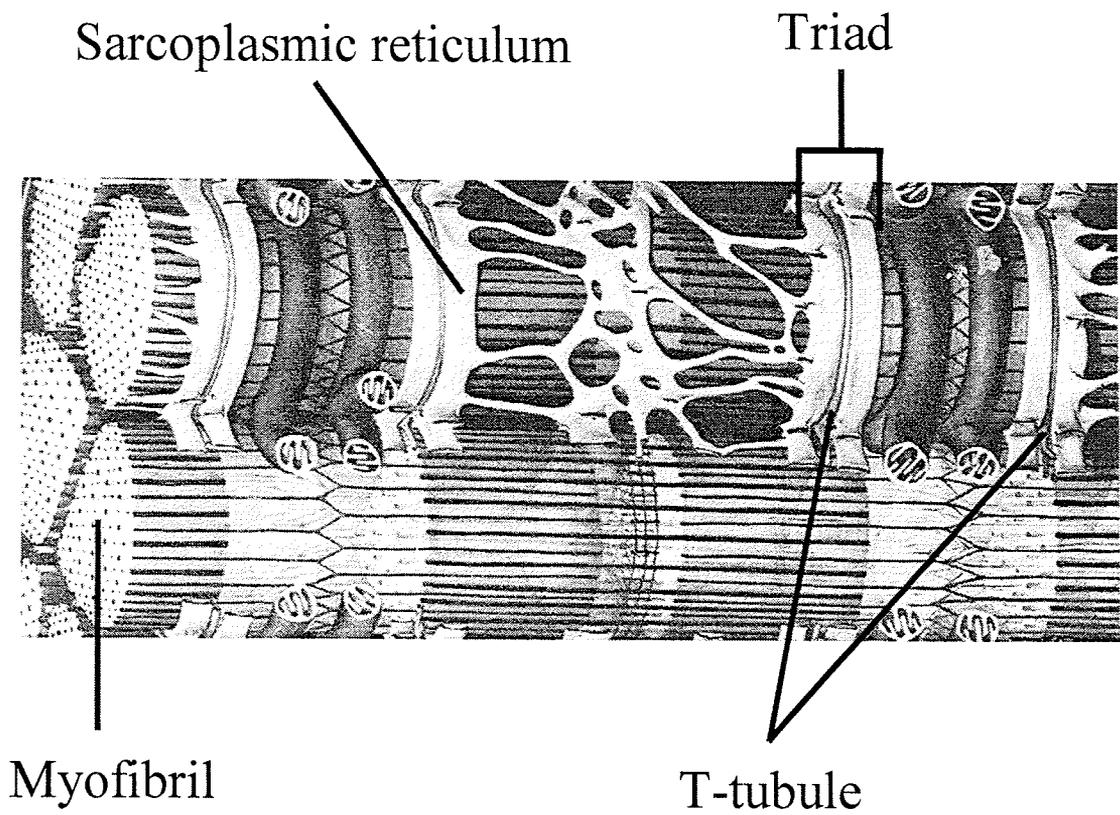


Fig. 1. Sarcomeric array of membrane system in skeletal muscle fiber.
(from Yamamoto and Maruyama 1986)

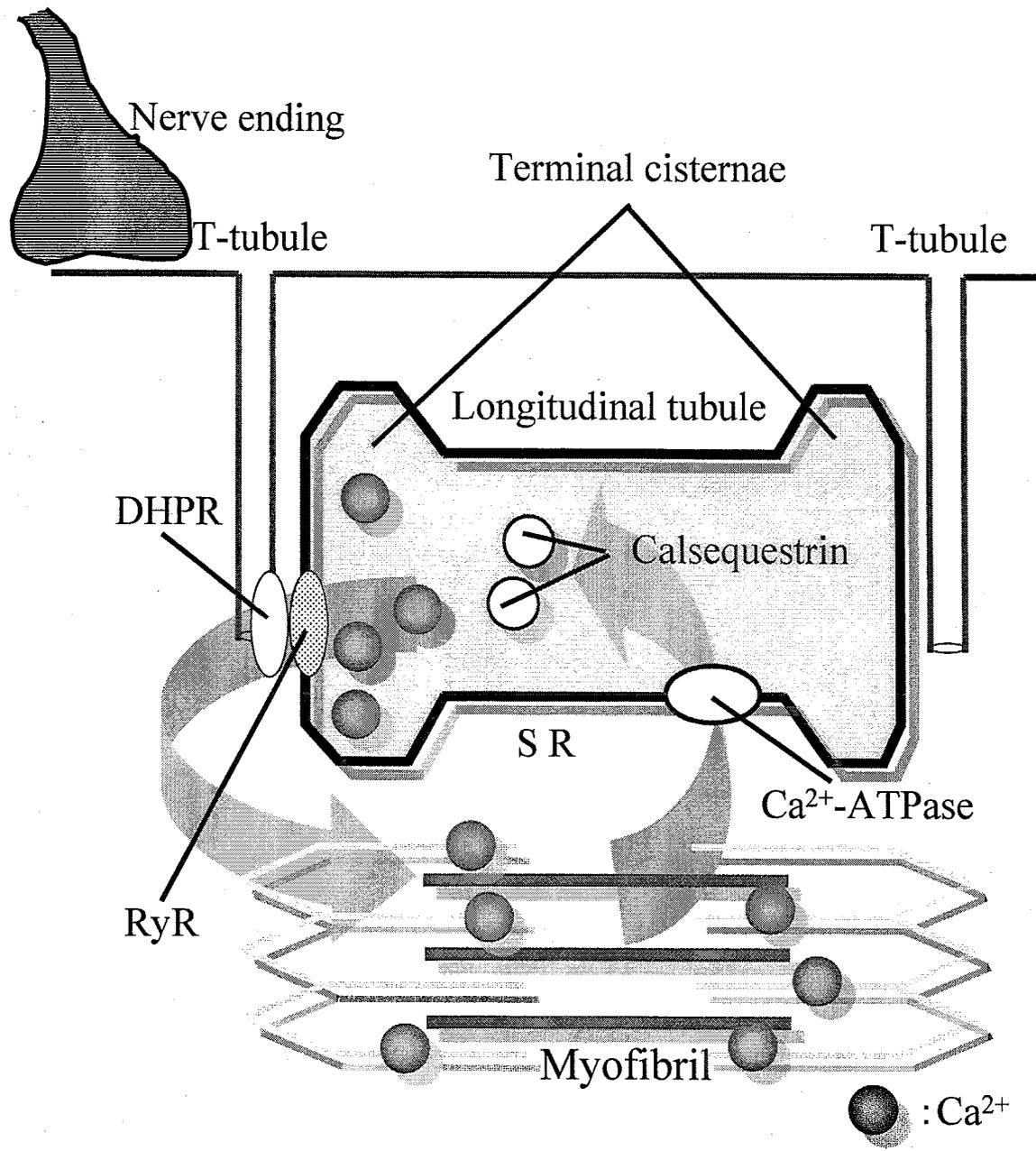


Fig. 2. A diagrammatic representation of the major components of a muscle cell involved in excitation-contraction coupling. Abbreviations: SR, sarcoplasmic reticulum; DHPR, dihydropyridine receptor; RyR, ryanodine receptor.

B. リアノジン受容体

SR 終末槽の T 管側に存在する RyR は、4つのサブユニットから構成される四量体であり、1つのサブユニットの分子量は 400~565 kDa である。この器官は Ca^{2+} 放出チャネルであり、DHPR からのシグナルに応じて、SR 内腔に蓄えられている Ca^{2+} を筋形質へと放出する。心筋では RyR からの Ca^{2+} 放出は、RyR 周辺の Ca^{2+} 濃度がわずかに上昇することによっても起こり、この放出の仕組みは Ca^{2+} 誘因性 Ca^{2+} 放出と呼ばれる (竹島 1998)。しかしながら、骨格筋では Ca^{2+} 誘因性 Ca^{2+} 放出は起こらず、DHPR からの経路のみが筋形質の Ca^{2+} 濃度上昇を招来していると考えられている。

遺伝子解析により、RyR には複数のアイソフォームがあることが明らかとなり (Berchtold et al. 2000)、哺乳動物では、骨格筋に主としてみられる RyR-1、心筋にみられる RyR-2 および脳にみられる RyR-3 の 3 種類が存在する (竹島 2003)。RyR-3 は、まれにはあるが骨格筋においても観察される場合がある。最近の研究では、RyR-1 および RyR-2 では、一酸化窒素が RyR を構成するスルフヒドリル (SH) 基に結合し、チャネルを活性化することが示されている (Xu et al. 1998)。

3. Ca^{2+} の取り込みに関与するタンパクとその機能

SR の膜上に無数に存在する Ca^{2+} -ATPase は、 Ca^{2+} ポンプとして作用し、 Ca^{2+} を筋形質から SR 内腔へと輸送している (和田ら 2001)。 Ca^{2+} の取り込みは、SR Ca^{2+} -ATPase によって能動的に行われ、ATP 1 分子の加水分解によって 2 原子の Ca^{2+} が SR 内腔へ輸送される。ATP の分解部位と Ca^{2+} 結合部位とは離れており、ATP および Ca^{2+} は細胞質側から SR Ca^{2+} -ATPase に結合する。SR Ca^{2+} -ATPase には Ca^{2+} に対して高親和性を示す E1 と低親和性を示す E2 の状態があり、E1 の時は開口部が細胞質側に向いている (Fig. 3)。ATP が ADP と P_i に分解されると SR Ca^{2+} -ATPase はリン酸化され、リン

酸化中間体を形成し、開口部が SR の内側を向くようになる。次に SR Ca^{2+} -ATPase は E2 の状態になり、 Ca^{2+} との親和性が低下するため、2 原子の Ca^{2+} は SR Ca^{2+} -ATPase から解離する。SR 内腔の終末槽には Ca^{2+} 結合タンパクであるカルセクエストリンが局在しており、取り込まれた Ca^{2+} はこのタンパクと結合し、貯蔵されている。 Ca^{2+} が SR 内へ取り込まれると、細胞質内の Ca^{2+} 濃度が低下し、筋は弛緩する。SR 内腔の Ca^{2+} 濃度が高まると、 Ca^{2+} の取り込み速度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 SR Ca^{2+} -ATPase からの Pi の解離速度が減少するため、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が抑制されることに素因があるとされている (Yamada and Tonomura 1972)。

4. 遅筋線維と速筋線維の筋小胞体の特徴

SR による Ca^{2+} 取り込み能力は、遅筋と比べると速筋の方が 6 倍以上も高いが、これには次に述べる 3 つのことに原因がある。第一は、SR の発達度合いが筋のタイプによって異なることであり、ラットの場合、筋線維に占める SR の容量は速筋で約 9% であるのに対し (Davey and O'Brien 1978)、遅筋では 3% 程度である (Davey and Wong 1980)。第二は、SR Ca^{2+} ATPase の量的な違いであり、速筋の SR では膜の 70~90% が Ca^{2+} ATPase の粒子で覆われているのに対し、遅筋では 6~10% である (Dux and Martonosi 1984)。第三は、発現している SR Ca^{2+} ATPase のアイソフォームが、速筋と遅筋とで異なることである。SR Ca^{2+} ATPase には 3 つのアイソフォーム (SERCA1, 2, 3) が存在する。SERCA1 は速筋のみに、SERCA2 は心筋、遅筋線維および平滑筋に発現することが知られている。SERCA3 の mRNA は胃や腸、肺の細胞に発現しているが、そのタンパクレベルの情報はほとんど明らかになっていない。

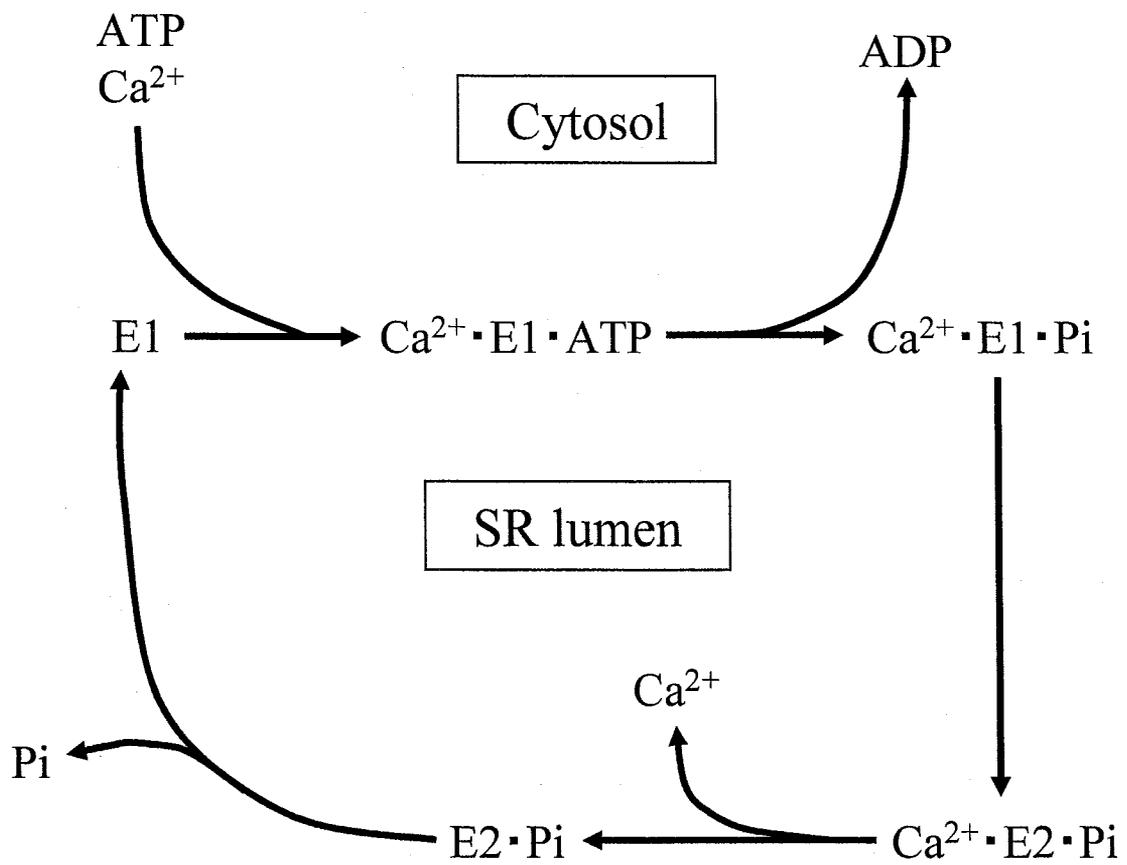


Fig. 3. The reaction cycle of sarcoplasmic reticulum calcium pump.
 E1 and E2 represent Ca^{2+} -ATPase conformations with high and low calcium affinity, respectively.

遅筋と速筋のSRでは、 Ca^{2+} の取り込みを調節するメカニズムに異なる点があり、例えば、遅筋および心筋のSRは Ca^{2+} の取り込みに対して調節作用を持つフォスホランバンと呼ばれるタンパクを有している (Jorgensen and Jones 1986)。これがcAMP依存性キナーゼやカルモジュリン依存性キナーゼなどによってリン酸化されると、SR Ca^{2+} -ATPaseの Ca^{2+} に対する親和性が増し、SR Ca^{2+} -ATPase活性および Ca^{2+} 取り込み能力が増加する (LePeuch and Demaille 1989)。

5. 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化

数分以内で運動が終了する高強度活動を行なうと、SR Ca^{2+} -ATPase活性あるいはSRの Ca^{2+} 取り込み能力が低下することが広く認められている。例えば、Matsunaga et al. (2003)は、高強度運動後にラットの外側広筋表層部におけるSR Ca^{2+} -ATPase活性が約25%、 Ca^{2+} 取り込み能力が約35%低下したと報告している。さらに、ヒトを対象に行われた実験では、Gollnick et al. (1991)およびLi et al. (2002)が膝伸展運動後に外側広筋のSRの機能が40%以上も低下したと報告している。ただし、電気刺激により収縮活動を誘起した場合は統一した見解が得られておらず、速筋および遅筋のSRの Ca^{2+} 取り込み能力は変化しない (Dosssett-Mercer et al. 1995)、遅筋の Ca^{2+} 取り込み能力は低下するが速筋では増加する (Holloway et al. 2006)などの報告がなされている。

高強度運動による筋疲労時のSRの機能変化については数多く報告されているものの、収縮活動に伴う機能変化の様相を経時的に検討した結果は、ほんのわずかしが報告されていない。Matsunaga et al. (2007)は、ラットを対象に高強度走行運動を2.5分間もしくは疲労困憊に到るまで行わせたところ、 Ca^{2+} 取り込み能力は運動開始2.5分後では低下しないが、疲労困憊時に約30%低下することを示した。また、SR Ca^{2+} -ATPase

活性は運動開始 2.5 分後に約 20%低下し、疲労困憊時では約 25%低下することを明らかにした。ただし、この実験では観察ポイントが運動開始 2.5 分後、および疲労困憊時の 2 点に限られていることから、収縮活動に伴う SR の機能変化の全容を示したとは言い難く、今後さらに詳細な検討が必要である。

6. 収縮後の回復期における筋小胞体の機能の経時的変化

高強度筋活動後の回復過程における SR の機能の経時的変化については、疲労に到る過程を検討することと比べ、実験的に容易に測定を行うことができることから、数例報告されている。Byrd et al. (1989) は、サラブレッドに高強度運動を疲労困憊に到るまで行わせ、その後の回復過程を観察した。その結果、走行直後に低下した SR の Ca^{2+} 取り込み能力および SR Ca^{2+} -ATPase 活性が、60 分間の回復期間を置くことによって、安静時の値まで回復したと報告している。また、ヒトの外側広筋を対象に行った Gollnick et al. (1991) の報告では、膝伸展運動終了直後に約 40%低下した SR の機能が、30 分後には安静時の値まで回復することが認められている。さらに、Hill et al. (2001) は、脚伸展運動後、外側広筋の SR Ca^{2+} 取り込み・放出機能および SR Ca^{2+} -ATPase 活性は 25~35%低下するが、運動終了 3.5 時間後には安静時の値に戻ることを観察している。ただし、これらの研究はいずれも回復期の一時期しか観察していないことから、経時的にどのような回復過程をたどるのかは不明である。

ラットを対象にした研究では、高強度走行終了時に約 25%低下した速筋の Ca^{2+} 取り込み機能および SR Ca^{2+} -ATPase 活性が、運動終了 60 分後に安静時の値にまで戻ることが、三島ら (2006) によって報告されている。これに対して、電気刺激による収縮活動後の SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を検討した Holloway et al. (2006) の報告では、遅筋では刺激終了直後に約 20%低下し、その後も回復することはなかったが、速筋で

は刺激終了直後に約 15%上昇し、その後も上昇した状態が維持されていることが示されている。

7. 筋小胞体による Ca^{2+} 取り込み能力減少の要因

A. 水素イオン濃度

SR Ca^{2+} -ATPase は水素イオン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、リン酸化中間体の形成速度が低減すること (Mandel et al. 1982)、および SR Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 結合部位において 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中 pH が 6.5 以下に低下することが認められており (Metzger and Fitts 1987)、このタイプの運動に伴ってみられる Ca^{2+} 取り込み能力の低減に、pH の低下が関与していると考えられる。しかしながら、低 pH にインキュベートした後 pH6.8 の溶液に戻すと、迅速に SR Ca^{2+} -ATPase 活性が回復することから (Mandel et al. 1982)、pH の低下はタンパクの構造そのものに甚大な影響を及ぼさないことが示唆される。

B. 無機リン酸

筋形質における P_i の濃度は、通常 1~5 mM の範囲に保たれているが、高強度運動後では 20~40 mM にまで達する (Cady et al. 1989, Godt and Nosek 1989)。Duke and Steele (2000) は、単一筋線維を用いた実験から、 P_i の濃度が高まると SR Ca^{2+} -ATPase が正常とは反対方向に作動し、SR 内腔から Ca^{2+} が漏出することを報告している。このように SR からの Ca^{2+} の漏出が生じると、SR の Ca^{2+} 取り込み能力が低下し、筋線維の収縮・弛緩のサイクルが円滑に遂行されなくなると考えられている。

C. ATP 結合部位の修飾

fluorescein isothiocyanate (FITC) は、ATP 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 SR Ca^{2+} -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付けている。

D. 活性酸素種

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、種々の機能障害をもたらすことがある。SR Ca^{2+} -ATPase が酸化されると、この酵素活性が ROS の濃度に依存して低下し、SR の Ca^{2+} 取り込み機能が抑制されることが、*in vitro* の実験によって示されている (Favero et al. 1998)。高強度運動によって SR Ca^{2+} -ATPase の酸化が生じることは、100%最大酸素摂取量に相当する強度で走行を行わせたラットの骨格筋では、SR Ca^{2+} -ATPase 活性値の減少とともに ATPase に含まれるカルボニル基の量が増加することを認めた、Matsunaga et al.

(2003) の報告によって示されている。しかしながら、SR の構造維持に重要な役割を果たしていると考えられている SH 基は、収縮による酸化ストレスに曝露されても修飾を受けないことが認められており (Klebl et al. 1998, Matsunaga et al. 2003)、ROS がどのようなメカニズムで SR Ca^{2+} -ATPase の機能に影響を及ぼしているのかについては明らかでない。

E. 筋グリコーゲン

筋グリコーゲンは、筋形質中に均一に分布しているのではなく、多く存在する部位とそうではない部位とがある。SR は前者にあたり、多量のグリコーゲンが膜に付着している (Lees et al. 2001)。解糖系酵素であるグリコーゲンフォスホリラーゼ (GP) は、この SR に付着するグリコーゲンを介し SR に結合している (Lees et al. 2001)。そのため、代謝の亢進にともない SR に付着するグリコーゲンが分解されると、GP が SR の膜から解離することになる。Cuenda et al. (1991) は、in vitro において SR に GP を添加すると、SR Ca^{2+} -ATPase の ATP 結合部位の構造が変化し、ATP に対する親和性が増加することを認めている。このことは、GP が ATP 結合部位の構造に影響を及ぼしていることを示唆している。

8. 筋小胞体による Ca^{2+} 放出能力減少の要因

A. 無機リン酸

Pi が SR の Ca^{2+} 放出能力に影響を及ぼすことを最初に指摘したのは Fryer et al. (1995) であり、彼らは単一筋線維を 50 mM Pi に曝露すると、SR から放出される Ca^{2+} の量が著しく低下することを報告した。この 50 mM という値は非生理的な値であるが、その後、生理的範囲内の濃度 (10~20 mM) でも Ca^{2+} 放出量の低下が起こることが、Posterino and Fryer (1998) によって報告されている。Pi が Ca^{2+} 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^{2+} と結合し沈殿物を形成する。 Ca^{2+} -カルセクエストリン複合体と比べると、Pi は Ca^{2+} と強く結合するため、Pi と結合した Ca^{2+} は放出に利用されにくく、そのために Ca^{2+} 放出が低下するとされている。SR には、ATP 依存性の Pi トランスポーターが存在していることが示されており (Fryer et al. 1997)、このトランスポーターを介し多くの Pi が SR 内腔へと流入する

ことが示唆されている。

B. 活性酸素種

ROS が, SR の Ca^{2+} 取り込み能力に対し負の影響を及ぼしていることは先に述べたが, Ca^{2+} 放出チャネルの構造に対しては二相性の反応を誘起する. Favero et al. (2003) は, 開口状態の Ca^{2+} 放出チャネルに結合する植物性アルカロイドであるリアノジンを用い, ROS による酸化が Ca^{2+} 放出チャネルの構造に及ぼす影響を検討した. その結果, 低濃度の ROS に SR を曝露するとリアノジン結合量が増加するが, さらに濃度を高めると逆にリアノジン結合量が減少することを認めた. そして, このような現象が生じるのは, Ca^{2+} 放出チャネルには, ROS に対し感受性の非常に高い SH 基が存在し, これらがある程度酸化されると Ca^{2+} 放出チャネルを開口状態にするが, ROS 濃度の上昇に伴ないさらに多くの SH 基が酸化されるとチャネルが閉口状態になるからであろうと推察している. ただし, リアノジン結合量が大幅に低減するような濃度の ROS に曝露している場合でも, Ca^{2+} 放出速度の低下が起こらないことがあり (Favero et al. 2003), リアノジン結合量と Ca^{2+} 放出速度の関連性については, 十分考慮する必要がある.

Ⅲ章 研究の目的および課題

先行研究によって、1)SR タンパクの酸化、2)SR の ATP 結合部位の構造的変化あるいは 3)SR に付着するグリコーゲン含有量は、SR Ca^{2+} -ATPase の機能を左右することが示唆されてきた。しかしながら、このことを示すいずれの報告も、収縮終了後のある一時期について検討したものであり、SR Ca^{2+} -ATPase 活性とこれらの要因が単に同期して変化したにすぎない可能性がある。本研究では、収縮活動に伴う SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化に、この3つの要因が本当に関与しているか否かを解明するために、以下の研究課題を設定した。

実験 1 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化

電気刺激による収縮活動が SR の機能に及ぼす影響について、経時的な変化に着目して検討する。

実験 2 収縮活動後の回復期における筋小胞体の機能の経時的変化

電気刺激による収縮活動後の回復期において、SR の機能がどのように変化するかを経時的な観点に着目して検討する。

実験 3 収縮活動後の回復期における筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の要因

電気刺激による収縮活動後の回復期において、SR Ca^{2+} -ATPase の機能変化に影響を及ぼす要因について、タンパクの酸化および ATP 結合部位の修飾に着目して検討する。

実験 4 グリコーゲンの減少が筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能およびその構造に及ぼす

影響

SR に付着するグリコーゲン量の減少が, SR Ca^{2+} -ATPase 活性の機能およびその構造に及ぼす影響について検討する.

IV章 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 1)

1. 目的

筋原線維の収縮・弛緩は、筋形質内の Ca^{2+} 濃度によって制御されている。通常、 Ca^{2+} はSR内腔に蓄積されているため、筋形質の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_f$) は $0.1 \mu\text{M}$ 以下に保たれている。SRからの 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SR Ca^{2+} -ATPaseによって行われている。 Ca^{2+} 放出チャネルが開くと、SR内腔より拡散により Ca^{2+} が放出され筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_f$ は $1 \mu\text{M}$ 以上に達する。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。このように、筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_f$ はSRによって調節されており、SRは筋原線維の収縮・弛緩において重要な役割を果たしている器官であるといえる。

骨格筋が収縮活動を継続して行くと、次第に発揮張力が低下することは周知の事実であり、この現象は一般的に「筋疲労」と呼ばれている。近年、骨格筋に収縮を繰り返し負荷すると、発揮張力の低下に伴い筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_f$ も低減することが報告されている (Tupling 2004)。さらに、疲労した筋においてSRの Ca^{2+} 取り込み・放出能力の低下も報告されていることから (Hill et al. 2001, Li et al. 2002, Matsunaga et al. 2007)、SRの機能低下が筋疲労を招来する要因のひとつとして注目されるようになったのである (Favero 1999)。

収縮活動に伴いSRの機能が低下する要因として、収縮中発生するROSによるタンパクの酸化 (Matsunaga et al. 2003)、SRに付着するグリコーゲン量の減少 (Lees et al. 2001)、ATP結合部位の修飾 (Leberer et al. 1987, Luckin et al. 1991) などがあげられているが、いずれも推測の域を脱し得ないものである。なぜなら、SRの機能変化

とある因子との関連性を示した報告はいずれも、安静時と収縮開始後の一時期の比較に基づくものであるからである。もし、収縮活動に伴い SR の機能が徐々に変化すれば、機能変化に関与すると考えられている要因がこれと類似した変化の様相を示すはずである。

本研究では、SR Ca^{2+} -ATPase の構造に影響を及ぼすとされてきた要因の経時的変化を測定し、それらが SR Ca^{2+} -ATPase の機能に及ぼす影響をすることを最終目的とした。そのために、坐骨神経に電気刺激を与え、筋収縮を誘起するモデルを開発したが、まず、収縮中 SR Ca^{2+} -ATPase 活性がどのように変化するのか把握する必要がある。そこで本実験では、収縮活動に伴う SR Ca^{2+} -ATPase 活性を経時的に検討することを第一の目的とした。また、筋収縮中の SR の機能の経時的変化を検討した報告はなされておらず、本実験では SR Ca^{2+} -ATPase 活性以外の機能の変化についても検討した。

2. 方 法

A. 被検動物および実験プロトコール

実験には、9 週齢の Wistar 系雄性ラットを 32 匹用いた。水および飼料（日本クレア製飼育繁殖固形飼料 CE-2）は、自由摂取とした。12 時間の明暗サイクルの照明下で温度を $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ に常時維持した飼育室において飼育した。8 週齢時から飼育を始め、一週間の予備飼育の後、実験に供した。

麻酔下においてラットを仰臥位に置き、末端が張力計（日本光電社製、TB-611T）につながれているフットホルダーに片脚を固定した。続いて、皮膚を切開し坐骨神経を露出し神経を傷つけないように電極を取り付けた後、皮膚を縫合した。この電極を介し、電気刺激装置（日本光電社製、SEN-7230）により矩形幅 1 msec、刺激頻度 75 Hz、トレイン幅 100 msec の電気刺激を 2 秒に 1 回の頻度で 1, 3, 5, 30 分間加えた。電気刺

激を負荷する脚を実験 (Stim) 側として、刺激を加えない反対脚をコントロール (Cont) 側として用いた。

B. 被検筋および筋タンパクの抽出

被検筋には、足関節底屈に主動的な役割を果たし、主に速筋線維から構成されている腓腹筋表層部 (GS)、速筋線維および遅筋線維が混在している腓腹筋深層部 (GD) および主に遅筋線維から構成されているヒラメ筋 (SOL) を用いた。電気刺激による収縮活動終了直後に被検筋を摘出し、一部 (約 20 mg) を代謝産物を測定するサンプルとして直ちに液体窒素で瞬間凍結した後、 -80°C の条件下で保存した。残りの筋を、氷で冷却した抽出液 (20 mM トリス/塩酸, 300 mM サッカロース, pH 7.4) でよく洗浄し、はさみとナイフを用いミンチ状に細かく刻んだ。その後、ガラスホモジナイザーを用い 9 倍 (mass/vol.) の抽出液でホモジナイズした。

C. 分析項目

c-1 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度

筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度の測定は、Lowry and Passonneau (1972) の方法に従い行った。筋を摘出した後、フリーズドライヤー (タイテック, VD-16 型) を用い -70°C で 24 時間凍結乾燥し、その後室温で数時間乾燥を続けた。筋重量を測定した後、予め冷却した 2 M 過塩素酸を 300 μl 加え、 -10°C で数分間放置した。 0°C で 10 分間遠心分離 (10,000 G) した後、得られた上清を筋中乳酸濃度、残りのペレットを筋グリコーゲン濃度の分析に用いた。

筋中乳酸濃度の測定では、得られた上清から 250 μl を取り、2 M 重炭酸カリウム 250 μl を加え中和し、その後さらに 10 分間遠心分離 (10,000 G) を行った。この上清 350 μl

に 100 mM 重炭酸カリウム (pH 7.5) を 650 μ l 加えたものをサンプルとして用いた。試験管に反応溶液 (100 mM ヒドラジン, 0.5 mM NAD, 100 mM 2-Amino-2-methyl-propanol, pH 10.0) を 1 ml 取り, サンプルを 10 μ l, 250 U/ml 乳酸脱水素酵素を 10 μ l (最終濃度 8 U/ml) 加えた。暗所に 60 分間放置した後, 蛍光値を分光蛍光光度計 (島津製作所 RF-5000) を用い, 励起波長 340 nm, 蛍光波長 460 nm にて測定した。

筋グリコーゲン濃度の測定では, 得られたペレットに 2 N の塩酸を 0.5 ml 加え 100°C で 2 時間加熱し, グリコーゲンをグルコースに加水分解した。その後, 2 N の水酸化ナトリウムを 0.5 ml 加え, これをサンプルとした。試験管に反応溶液 (1 M トリス/塩酸, 100 mM 塩化マグネシウム, 500 mM DTT, 300 mM ATP, 50 mM NADPH, 0.07 U/ml グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 0.17 U/ml ヘキソキナーゼ, pH 8.1) を 1 ml 取り, これにサンプルを 10 μ l 加えた。暗所に 60 分間放置した後, 蛍光値を分光蛍光光度計 (島津製作所 RF-5000) を用い, 励起波長 340 nm, 蛍光波長 460 nm にて蛍光値を測定した。

c-2. SR Ca²⁺取り込みおよび放出速度の測定

SR の Ca²⁺取り込みおよび放出速度の測定は, Ca²⁺蛍光指示薬である indo-1 を用い, 37°C の条件下で Ward et al. (1998) の方法に従って行った。実験に使用した反応溶液の組成は, 20 mM HEPES, 100 mM 塩化カリウム, 6.8 mM シュウ酸塩, 0.5 mM 塩化マグネシウム, 10 mM アジ化ナトリウム (pH 7.0) であった。サンプルを反応溶液に GS では 20 μ l, GD では 30 μ l, SOL では 40 μ l 加え, 37°C で 2 分間インキュベートした後, Mg-ATP (最終濃度 1 mM) を加えることによって反応を開始した。反応溶液中の [Ca²⁺]_i 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,

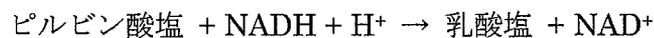
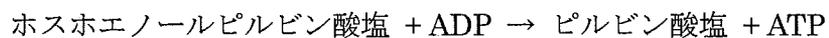
349 nm の波長で indo-1 を励起し、405 nm および 500 nm の蛍光量をモニターすることによって行った。[Ca²⁺]_f は、Grynkiewicz et al. (1985) の報告に従い、

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

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 Ca²⁺ と結合していない場合の蛍光比、R_{max} は全ての indo-1 が Ca²⁺ と結合している場合の蛍光比、F_f は全ての indo-1 が Ca²⁺ 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 Ca²⁺ と結合している場合の 500 nm 蛍光量である。また、K_d は解離定数であり、250 nM を採用した (Grynkiewicz et al. 1985)。SR の Ca²⁺ 放出速度の測定では、SR Ca²⁺ 取り込み速度の測定後、反応溶液中の遊離 Ca²⁺ 濃度の減少が完全に止まったことを確認し、10 mM (最終濃度) の 4-クロロ-*m*-クレゾールを加え、SR からの Ca²⁺ 放出を誘起した。

c-3. SR Ca²⁺-ATPase 活性の測定

SR Ca²⁺-ATPase 活性値は、Simonides and van Hardeveld (1990) の方法に一部修正を加えたものを用い、筋のホモジネイトから測定した。活性値は以下のカスケード反応を用いて、NADH の濃度の減少速度を測定することによって算出した。



用いた反応溶液の組成は、1 mM EGTA, 20 mM HEPES, 200 mM 塩化カリウム, 15 mM 塩化マグネシウム, 10 mM アジ化ナトリウム, 0.28 mM NADH, 10 mM ホスホエノールピルビン酸塩, 18 U/ml ピルビン酸キナーゼ, 18 U/ml 乳酸脱水素酵素, 0.8 mM 塩化カルシウム (pH 7.5) であった。測定は 37°C で行い、4 mM (最終濃度)

の ATP を加えることによって反応を開始し、NADH の濃度変化を分光光度計（日本分光社製、UVIDE-600）を用いて測定した（波長 340 nm）。その後、塩化カルシウムの濃度を 2 mM（最終濃度）にし、上記と同様にして NADH の濃度を測定した。高濃度の Ca^{2+} は、SR Ca^{2+} -ATPase のみを特異的に抑制する。したがって、初期の NADH の減少率と高濃度 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。

D. 統計処理

統計量は、平均 ± 標準誤差で示した。同一個体内の Cont 側と Stim 側との差異の検定には、対応のある Student's t-test を用いた。また、刺激時間による変化の差異を検討するため、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%未満とした。

3. 結果

A. 張力の変化

電気刺激による収縮に伴い張力は漸減し、初期値に対し 1 分後では 82%、3 分後では 64%、5 分後では 51%、30 分後では 46%にまで低下した (Fig. 4)。

B. 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度

Table 1 に、収縮活動に伴う GS, GD, SOL における筋グリコーゲン濃度および筋中乳酸濃度の結果を示した。GS の筋中グリコーゲン濃度は、いずれの刺激時間においても Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられ、Cont 側に対する割合は、収縮開始 1

分後では 40%，3 分後では 27%，5 分後および 30 分後では 17%であった。また，Stim 側間の比較では，収縮開始 1 分後に対し 30 分後で有意な低値がみられた。筋中乳酸濃度は，Cont 側に対し収縮開始 1 分後では 294%，3 分後では 244%，5 分後では 221%の値が観察された。しかしながら，収縮開始 30 分後では，Cont 側と Stim 側との間に有意な差異は認められなかった。

GD の筋グリコーゲン濃度は，収縮開始 1, 3, 5 および 30 分後のいずれにおいても，Cont 側に対し Stim 側で約 75%の値が観察された。筋中乳酸濃度は，収縮開始 1 分後においてのみ，Cont 側に対して Stim 側で有意な高値が認められた。SOL では，筋グリコーゲン濃度および筋中乳酸濃度ともに，収縮活動に伴う変化は認められなかった。

C. SR Ca²⁺取り込み速度

Fig. 5 に，SR Ca²⁺取り込み速度の変化を示した。GS の SR Ca²⁺取り込み速度は，いずれの収縮時間においても Con 側に対し Stim 側が有意な低値を示し，その値は約 70～80%の範囲であった。一方で GD では，刺激開始 3 分後および 5 分後において Cont 側と Stim 側との間に有意な差異が認められた。しかし，SOL ではいずれの収縮時間においても，収縮活動に伴う有意な差異は認められなかった。

D. SR Ca²⁺-ATPase 活性

収縮活動に伴う SR Ca²⁺-ATPase 活性は，SR Ca²⁺取り込み速度と類似した変化を示した (Fig. 6)。GS では，いずれの収縮時間においても Cont 側に対し Stim 側が有意な低値を示し，Con 側に対する Stim 側の値は，収縮開始 1 分後では 85%，3 分後では 74%，5 分後では 80%，30 分後で 84%であった。GD においては，収縮開始 5 分後に有意な差異がみられ，Cont 側に対する Stim 側の値は 88%であった。一方 SOL では，

収縮活動に伴う SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化は観察されなかった。

E. SR Ca^{2+} 放出速度

Fig. 7 に, SR Ca^{2+} 放出速度の変化を示した。GS の SR Ca^{2+} 放出速度の変化は, SR Ca^{2+} 取り込み速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性とは異なる様相を示した。収縮開始 1 分後では, Cont 側と Stim 側との間に有意差は認められなかったのに対し, 3 分後, 5 分後および 30 分後では, Stim 側が Cont 側に対し有意な低値を示した。一方, GD では, 収縮開始 5 分後および 30 分後において Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられ, さらに SOL では収縮活動に伴う変化は認められなかった。

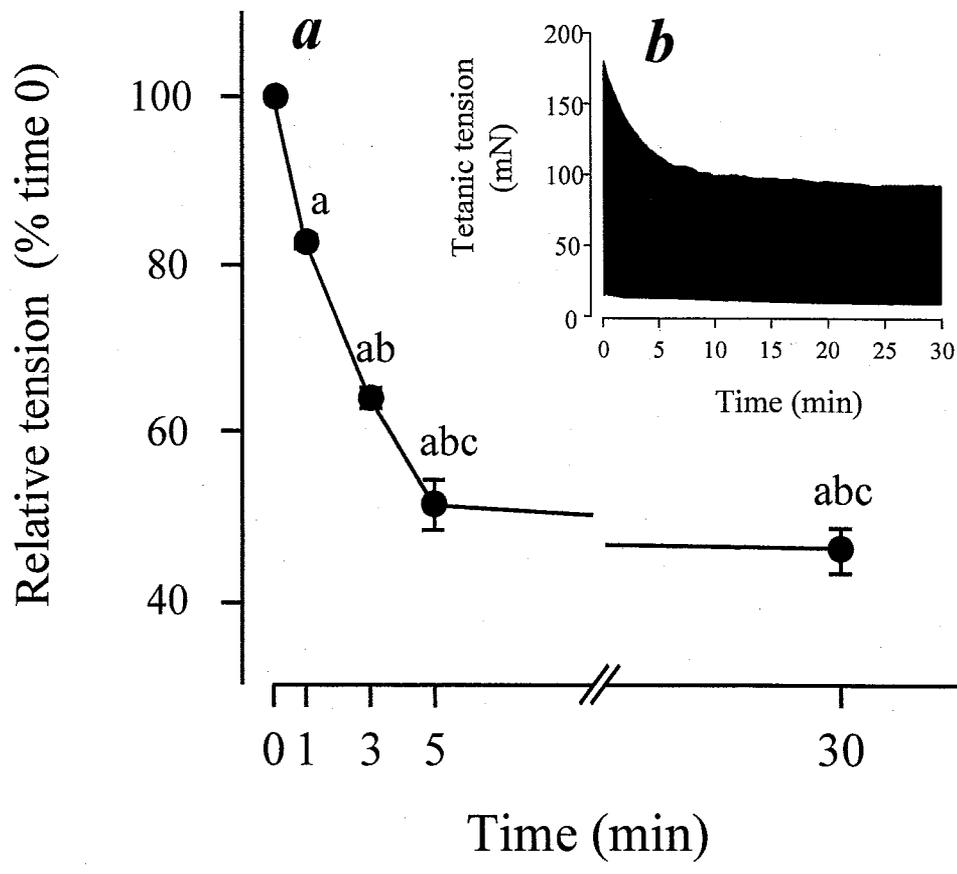


Fig. 4. Force output during tetanic contraction (a) and original force records from typical fatigue runs (b). Values are means \pm SE. ^a $P < 0.05$ vs 0 min. ^b $P < 0.05$ vs 1 min. ^c $P < 0.05$ vs 3 min.

Table 1. Concentrations of glycogen and lactate in different muscles.

Stimulation time	Glycogen		Lactate	
	Control	Stimulated	Control	Stimulated
GS				
1 min	119.3 ± 3.0	48.2 ± 5.1*	4.6 ± 0.2	13.5 ± 1.3*
3 min	118.5 ± 4.3	31.8 ± 3.7*	4.9 ± 0.5	12.0 ± 1.0*
5 min	118.2 ± 5.3	32.4 ± 3.3*	3.9 ± 0.2	11.9 ± 0.9*
30 min	119.1 ± 3.2	20.4 ± 5.9*	3.9 ± 0.2	5.8 ± 0.5 [§]
GD				
1 min	113.0 ± 6.8	87.3 ± 11.0*	4.2 ± 0.3	5.6 ± 1.4*
3 min	117.5 ± 4.2	86.8 ± 7.4*	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.2
5 min	112.8 ± 5.9	83.1 ± 7.2*	3.9 ± 0.2	5.2 ± 1.0
30 min	113.1 ± 3.3	82.4 ± 5.1*	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.2
SOL				
1 min	73.9 ± 7.5	58.5 ± 14.7	4.4 ± 0.7	4.7 ± 0.8
3 min	94.5 ± 7.6	84.2 ± 6.0	3.7 ± 0.4	3.9 ± 0.2
5 min	78.3 ± 9.5	70.6 ± 9.4	3.6 ± 0.5	4.2 ± 0.6
30 min	82.2 ± 8.7	65.1 ± 7.5	3.4 ± 0.4	3.2 ± 0.2

Values are means ± SE; n = 8. Glycogen concentrations are expressed in μmol glycosyl units/g dry wt. Lactate concentrations are expressed in μmol/g dry wt. **P* < 0.05 vs control within rats. [§]*P* < 0.05 vs 1, 3 and 5 min within stimulated.

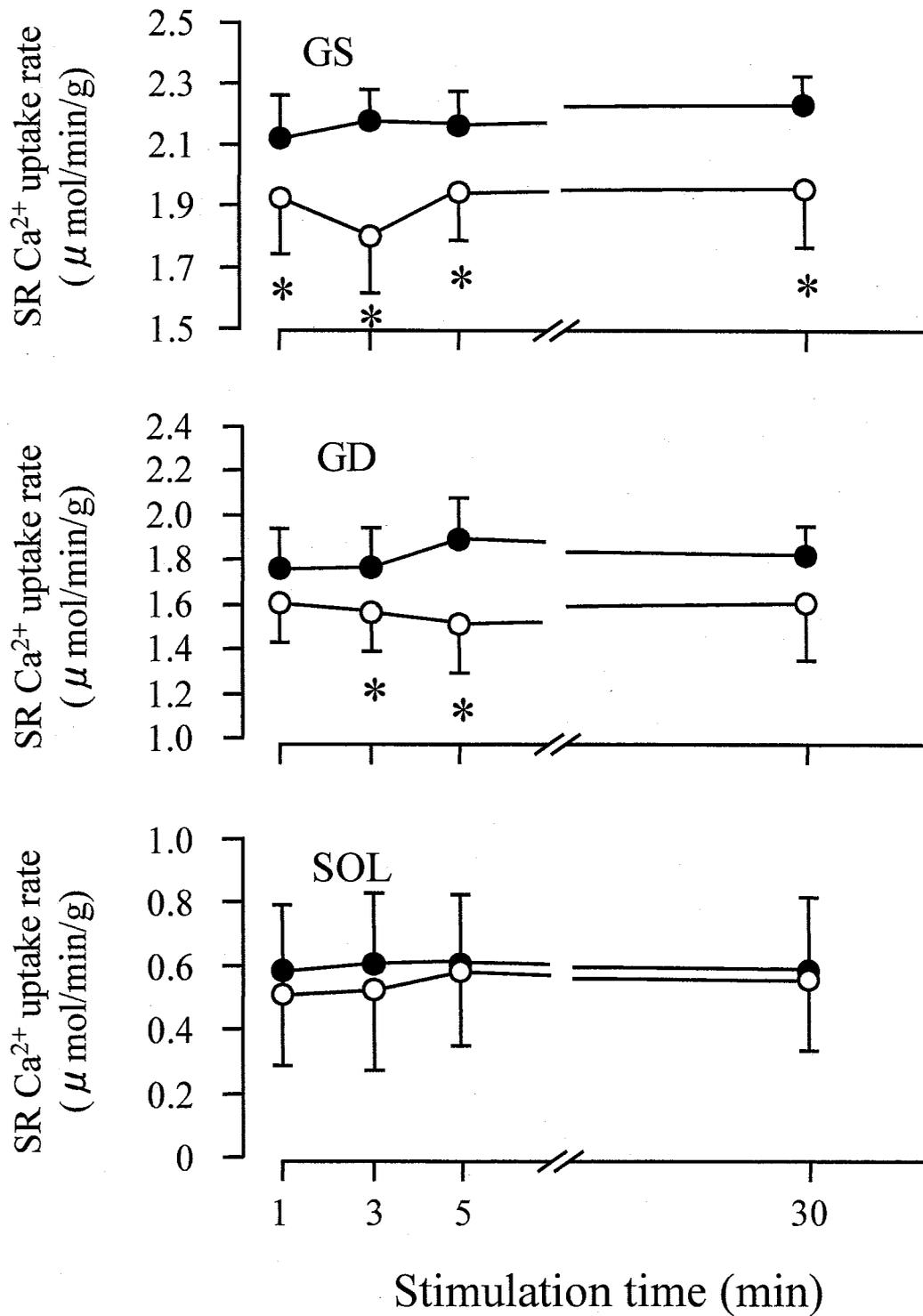


Fig. 5. Changes in Ca²⁺ uptake rates of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means ± SE. * *P* < 0.05 vs control.

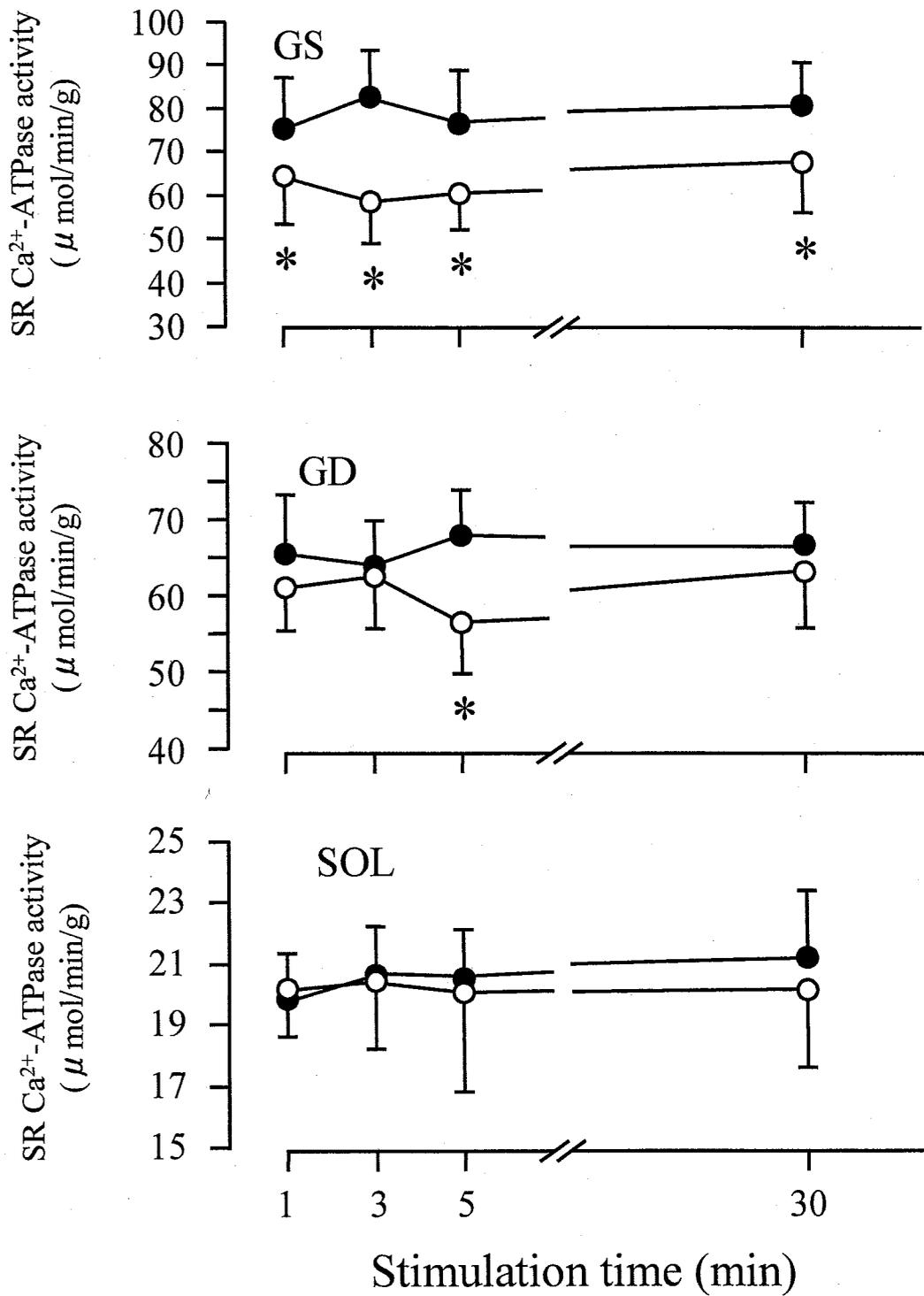


Fig. 6. Changes in Ca²⁺-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means ± SE. * *P* < 0.05 vs control.

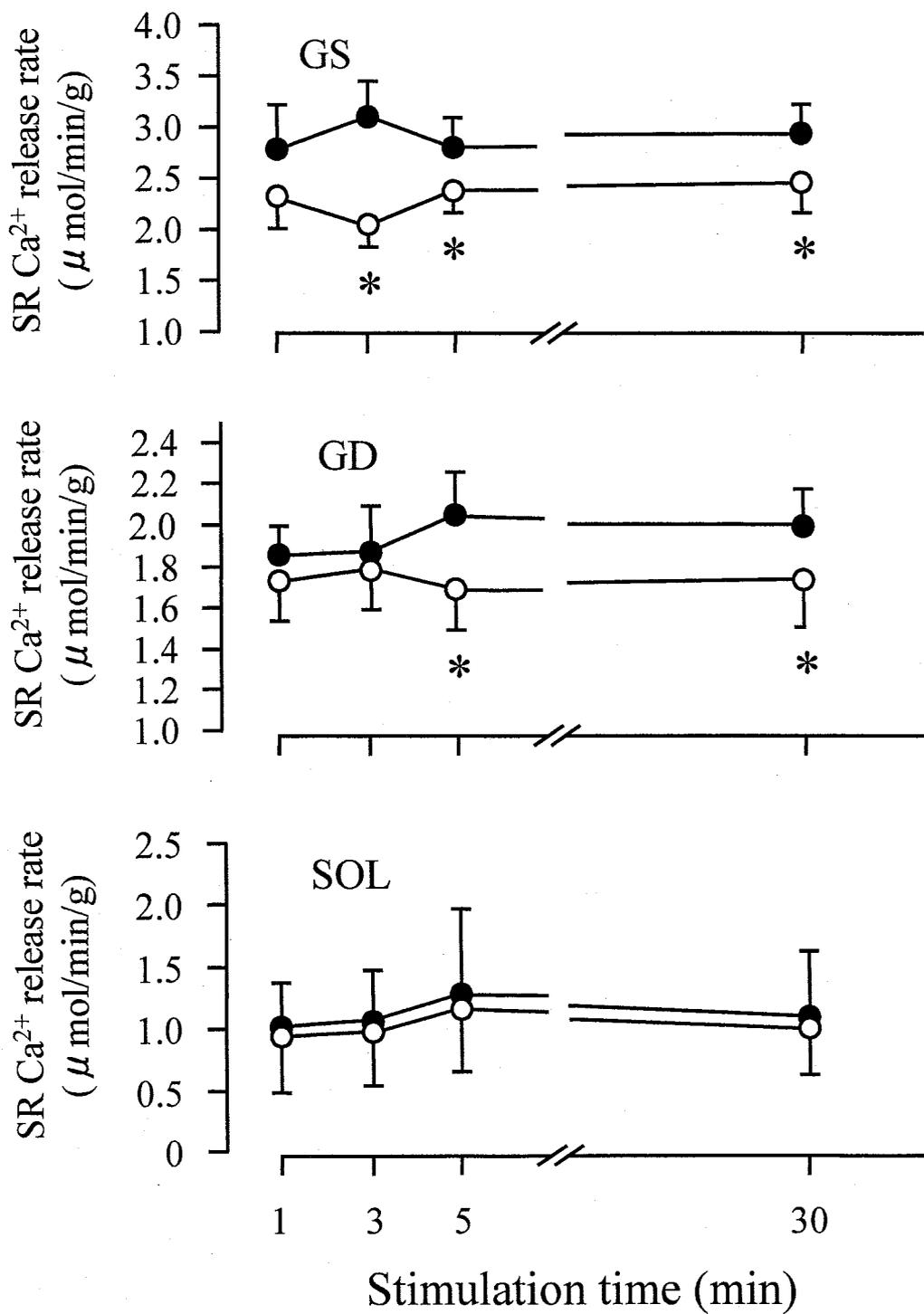


Fig. 7. Changes in Ca²⁺ release rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius and soleus (SOL) of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means ± SE. * *P* < 0.05 vs control.

4. 考 察

SR の機能変化の要因を探るためには、筋を精製し SR が大量に含まれるミクロソームを必要とする場合が多い。このようなサンプルを得るためには、グラム単位の筋が必要であり、ヒトを対象に研究を行うことは現実的には困難である。そこで、この種の実験では飼育や解剖の簡便性も踏まえ、ラットをはじめとした齧歯類を被検動物として用いることが多い。ラットのような齧歯類を被検動物とすると、筋を多量に得ることができるといふ利点がある反面、自発的運動を行なわせる場合、負荷する運動強度や運動量を厳密に制御することが難しいといった問題が生ずる。本研究では、収縮活動に伴う SR の機能の変化を経時的に検討することが目的であるため、この場合、上記の理由から自発的運動を採用することは適切ではない。そこで本研究では、発揮張力の変化をリアルタイムで把握しながら筋収縮を繰り返し負荷することが可能な電気刺激を収縮活動を誘起する方法として用いた。

本実験の結果より、GS では 5 分間の収縮活動によって、筋グリコーゲン濃度は安静時の約 30% にまで低減し、筋中乳酸濃度は約 3 倍に増加することが確かめられた (Table 1)。ラットを対象に行われた先行研究では、疲労困憊に至るまでの高強度走運動終了直後では、筋グリコーゲン濃度は安静時の 21% にまで低下、筋中乳酸濃度は 136% 上昇することが報告されている (Dossett-Mercer et al. 1994)。この知見からは、本実験で用いた収縮様式は、高強度運動をシミュレートしたものであると考えられる。

本研究で得られた最も重要な知見のひとつに、GS では収縮活動の継続時間に対して、SR の Ca^{2+} 取り込み機能は漸減するのではなく、収縮開始直後に低下し、以後、その低下が維持されたことがあげられる。SR による Ca^{2+} 取り込み能力は、SR Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} 回収能力と Ca^{2+} を SR の膜の内部に保持する能力とのバランスによって決まる。Fig. 5 および Fig. 6 に示されるように、SR Ca^{2+} 取り込み速度と SR

Ca²⁺-ATPase 活性とでその変化が類似していたことから、少なくとも本実験で用いた条件下では、SR Ca²⁺取り込み速度は、SR Ca²⁺-ATPase 活性によって主に規定されていることが示唆される。

本実験では、GS の SR Ca²⁺-ATPase 活性は、収縮開始 1 分後にはすでに約 20% 低下していたことが認められた (Fig. 6)。ラットに高強度走行運動を疲労困憊に至るまで行なわせると、GS の SR Ca²⁺-ATPase 活性が約 20%~30% 低下することが報告されている (Matsunaga et al. 2003, 2007)。本実験で用いた収縮負荷では、収縮開始 5 分後まで張力は漸減することが観察されたが (Fig. 4)、収縮開始 1 分後では 10% 程度しか張力は低下しておらず、この時点で腓腹筋が著しく疲労しているとみなすことはできない。それにも関わらず、SR Ca²⁺-ATPase が約 20% 低下していたことは、この時点では *in vitro* で測定される SR Ca²⁺-ATPase 活性の低下は、発揮張力の低下とは直接関連していないことを示唆するものである。

GS では、SR Ca²⁺取り込み速度および SR Ca²⁺-ATPase 活性とは異なり、SR Ca²⁺放出速度は、収縮開始 3 分後以降において低下することが観察された (Figs. 5, 6 and 7)。骨格筋の Ca²⁺放出チャネルには、サブユニットあたり 101 個の SH 基が含まれている (Sun et al. 2001)。このうちの約 50 個が遊離 SH 基の状態にあり、Ca²⁺放出チャネルの構造および機能に対し重要な役割を果たしていると考えられている (Sun et al. 2001)。ラビットの骨格筋より精製した Ca²⁺放出チャネルを *in vitro* で ROS に曝露すると、これらの遊離 SH 基は ROS の濃度に依存して酸化的修飾を受けるが、酸化される SH 基が 10 個から 15 個までであれば、Ca²⁺放出チャネルの開口確率が高まるのに対し、さらに多くの SH 基が酸化されると、逆にチャネルがの開口確率は低下することが報告されている (Favero et al. 2003, Sun et al. 2001)。一方、SR Ca²⁺-ATPase 活性では、Ca²⁺放出チャネルとは異なり、ROS の濃度に依存して酵素活性が漸減すること

が認められており (Favero et al. 2003, Sun et al. 2001), このような ROS に対する感受性の違いが, Ca^{2+} 取り込み速度と放出速度とで経時的变化が異なった原因である可能性がある。

自発的運動では収縮に参加動員される筋線維のタイプは, 運動強度によって異なり, 強度は低いときは type I 線維のみが, 一方, 運動強度が高くなるにつれ, type IIa, type IIb 線維の順で動員されることが明らかになっている。したがって, 自発的運動を用い筋疲労に関する研究を行なう場合, 負荷する運動強度と実験に用いる筋の筋線維組成を念頭におく必要がある。これに対して, 本研究で用いた実験モデルでは, 腓腹筋および SOL に含まれる筋線維全てを収縮に参加させることが可能であり, 全てのタイプの筋線維に同一の負荷を与えることができる。主として type I 線維から構成される SOL では, 測定した項目全てに収縮に起因した変化はみられず, SR の機能の変化は筋線維タイプに大きく依存することが明らかになった。

5. 要 約

本実験では, Wistar 系雄性ラットを用い, 収縮活動に伴う筋小胞体 (SR) の機能の変化を経時的に検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し, 坐骨神経に 2 秒に 1 回, 75 Hz の電気刺激を 1, 3, 5, 30 分間加えることにより, 筋収縮を誘起した。刺激終了後, 直ちに腓腹筋表層部 (GS), 腓腹筋深層部 (GD) およびヒラメ筋 (SOL) を摘出し, 後の分析に用いた。電気刺激を加える脚を実験 (Stim) 側, 反対脚をコントロール (Cont) 側とした。電気刺激中の強縮張力, SR の Ca^{2+} 取り込み速度, Ca^{2+} 放出速度および Ca^{2+} -ATPase 活性を測定し, 次の結果を得た。

1. 収縮により発揮張力は漸減し、5分後には初期値に対し51%にまで低下した。以後、顕著な変化はみられず、刺激開始5分後と30分後との間には有意差は認められなかった。
2. GSでは、SR Ca²⁺取り込み速度およびSR Ca²⁺-ATPase活性は、測定した全ての刺激時間において、Stim側がCont側に対して有意な低値を示した。GDでは、SR Ca²⁺取り込み速度は刺激開始3分後および5分後、SR Ca²⁺-ATPase活性は刺激開始5分後において、Stim側がCont側に対し有意な低値を示した。SOLでは、収縮活動に伴うSR Ca²⁺取り込み速度およびSR Ca²⁺-ATPase活性の変化は認められなかった。
3. SR Ca²⁺放出速度は、GSでは刺激開始3分後、5分後および30分後において、Cont側と比較してStim側が有意な低値を示した。GDでは収縮開始5分後および30分後においてStim脚がCont脚に対し有意な低値を示したが、SOLでは収縮活動に伴う変化は認められなかった。

以上の結果より、GSではSR Ca²⁺取り込み速度およびSR Ca²⁺-ATPase活性は、収縮開始直後より低下し、以後大きく変化しないこと、またSR Ca²⁺放出速度はこれらと比較して遅れて低下することが明らかになった。また、収縮に伴うSRの機能の変化の様相は筋線維のタイプによって異なり、type II線維と比べtype I線維では変化が生じにくいことが認められた。

V章 収縮活動後の回復期における筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 2)

1. 目的

本研究の最終目的は、SR Ca^{2+} -ATPase の構造および機能に影響を及ぼすとされてきた要因について、筋収縮中の経時的変化を測定し、それらと SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化との関連性を検討することである。そのためには、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が漸減あるいは漸増するモデルを確立する必要がある。実験 1 では、30 分までの電気刺激を与え、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化について検討した。その結果、GS および GD では収縮により SR Ca^{2+} -ATPase 活性は低下するが、必ずしも漸減するわけではないことが認められ、望むべきモデルではないことが明らかになった。疲労困憊に至る運動により低下した SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、運動後安静を保つことにより、30~60 分で回復することが報告されており (三島ら, 2006)、回復期を利用すれば、本研究の目的を成就できる可能性がある。しかしながら、本研究で用いた電気刺激によって、回復期に SR Ca^{2+} -ATPase 活性がどのように変化するのは不明である。そこで本実験では、電気刺激終了後 60 分間までの SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の様相を検討することを目的とした。

骨格筋において、 Ca^{2+} は筋の収縮・弛緩だけでなく、ある種の酵素の活性やタンパクの合成も制御しており、筋細胞の生命活動に重要な役割を果たしている器官であるといえる。しかしながら、その一方で、筋形質の $[\text{Ca}^{2+}]_f$ が高まると、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼの働きを介し、タンパクの分解が促進され (Belcastro et al. 2000)、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 Ca^{2+} 恒常性の維持は、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 Ca^{2+} の恒常性は、主として SR

によって維持されており，このような細胞内における Ca^{2+} の作用および運動後にみられる SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下を考えると，回復期における SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を知ることは，筋の生理機能に対する影響という観点からも重要である．また，回復期における SR の機能の経時的变化について詳細に検討した報告はこれまでなされておらず，本実験では実験 1 と同様，SR Ca^{2+} -ATPase 以外の機能についても検討した．

2. 方法

A. 被検動物および実験プロトコール

実験には，9 週齢の Wistar 系雄性ラットを 40 匹用いた．水および飼料（日本クレア製飼育繁殖固形飼料 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を $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$ に常時維持した飼育室において，これらを飼育した．8 週齢時から飼育を始め，1 週間の予備飼育の後，実験に供した．

電気刺激による連続収縮収縮の方法は，実験 1 と同様であった．電気刺激前に安静時の張力-頻度特性のデータを得るために，単収縮および 40 Hz, 60 Hz, 80 Hz, 100 Hz の強縮刺激を 1 秒間加え，張力を測定した．その後，電気刺激（矩形幅 1 msec，頻度 75 Hz，トレイン幅 100 msec）を 2 秒に 1 回，5 分間加えた．刺激時間を 5 分としたのは，この刺激によって GS および GD の両方において，SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下することが実験 1 において観察されたからである．刺激を加えた脚を Stim 側，刺激を加えない反対脚を Cont 側として用いた．収縮終了直後，5 分，10 分，30 分および 60 分間の安静を保ち，再び張力-頻度特性を測定した後，GS および GD を摘出した．なお，筋の処置および筋ホモジナイズの方法は実験 1 と同様であった．

B. 分析項目

実験 1 と同様の方法を用い, SR Ca^{2+} 取り込みおよび放出速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性を測定した.

C. 統計処理

統計量は, 平均 \pm 標準誤差で示した. Cont 側と Stim 側との差異の検定, および安静時および回復期終了後の張力-頻度特性の差異の検定には, 対応のある Student's t-test を用いた. また, 回復時間による変化の差異を検討するため, 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%未満とした.

3. 結果

A. 張力-頻度特性

Fig. 8 は, 収縮を負荷する前の張力を 100%とした張力-頻度特性の結果を示している. 単収縮および 40~100 Hz のいずれの頻度においても, 収縮前の値と比較して収縮活動後の回復期における張力が, 有意に低い値を示した. また, 収縮終了直後では, いずれの頻度の張力も収縮前の約 60%の値を示したが, 40 Hz では収縮終了 60 分後が収縮終了 5 分後および 10 分後に対し有意な高値を示した. 60 Hz では, 収縮終了 30 分後が収縮終了直後および 5 分後, さらに 60 分後が収縮直後, 5 分後, 10 分後に対し有意に高い値を示した. 80 Hz と 100 Hz では類似した傾向がみられ, 収縮終了 10 分後, 30 分後, 60 分後が収縮直後と比較して有意な高値を示した. さらに, 80 Hz の 30 分後および 60 分後, 100 Hz の 10 分後, 30 分後および 60 分後が, 5 分後に対し有意な高値を示した.

B. SR Ca²⁺取り込み速度

SR Ca²⁺取り込み速度については、GS、GDともに収縮終了直後およびその後の回復期において、Stim側とCont側の間に統計的に有意な差異は認められなかった (Fig. 9).

C. SR Ca²⁺-ATPase 活性

Fig. 10 に、SR Ca²⁺-ATPase 活性の変化を示した。GS では、収縮終了 10 分後まで、Cont 側に対して Stim 側で有意な低値が観察された。それ以降、活性は回復することが観察され、収縮終了 30 分後および 60 分後では、両群間に差異は認められなかった。また、Stim 側間を比較した結果、収縮終了 5 分後に対し 30 分後で有意な高値が示された。GD では、収縮終了直後およびその後の回復期において、Cont 側と Stim 側との間に有意な差異は観察されなかった。

D. SR Ca²⁺放出速度

Fig. 11 に、SR Ca²⁺放出速度の変化を示した。GS の収縮直後における放出速度は、Stim 側で有意な低値を示し、Cont 側に対する Stim 側の割合は 77%であった。この低下は収縮終了 10 分後まで継続したが、30 分後および 60 分後は Stim 側と Cont 側との間に有意な差異は認められなかった。また、Stim 側間を比較したところ、収縮終了直後に対し 30 分後において有意な高値がみられた。一方 GD では、収縮直後およびその後の回復期において有意な変化は観察されなかった。

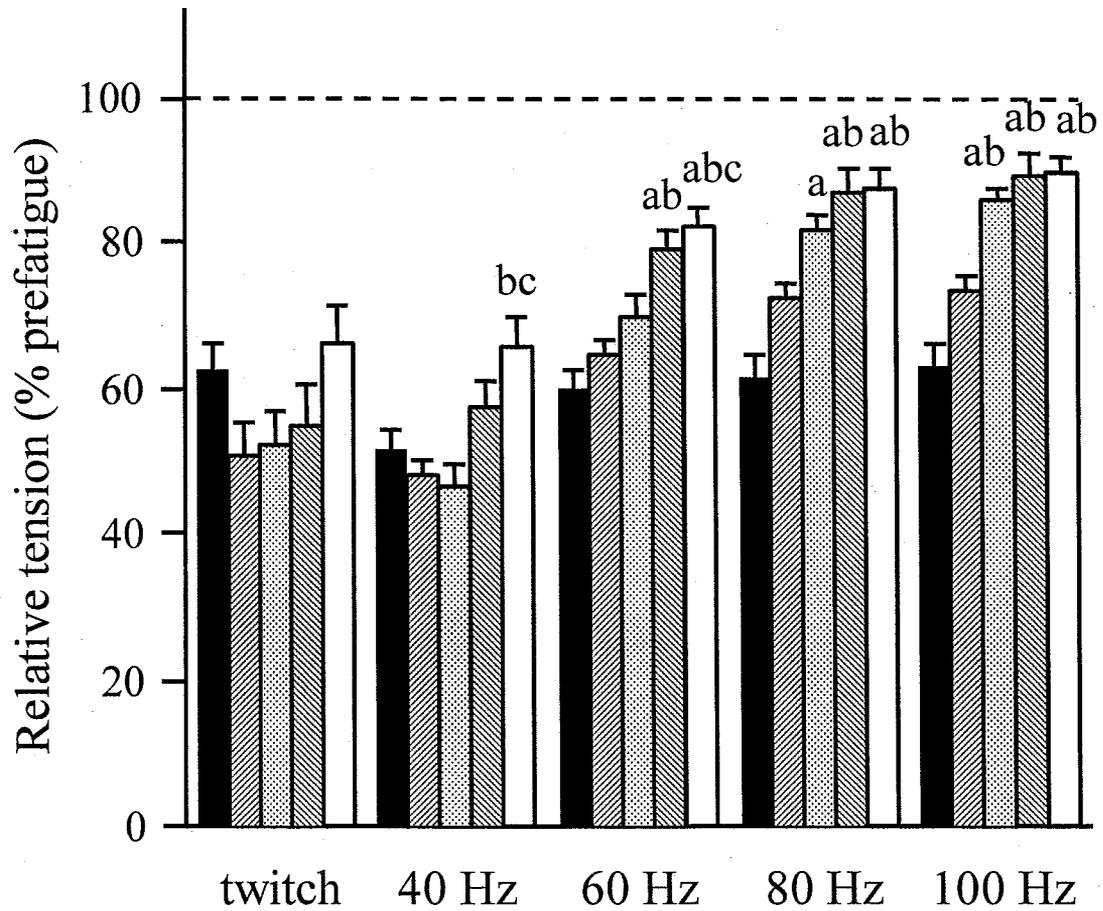


Fig. 8. Peak twitch and tetanic tension in gastrocnemius at different frequencies immediately (■), 5 min (▨), 10 min (▩), 30 min (▧) and 60 min (□) after fatiguing contraction. Values are means \pm SE. ^a $P < 0.05$ vs 0 min. ^b $P < 0.05$ vs 5 min. ^c $P < 0.05$ vs 10 min. During recovery period, all of values were significantly different from prefatigue ($P < 0.01$).

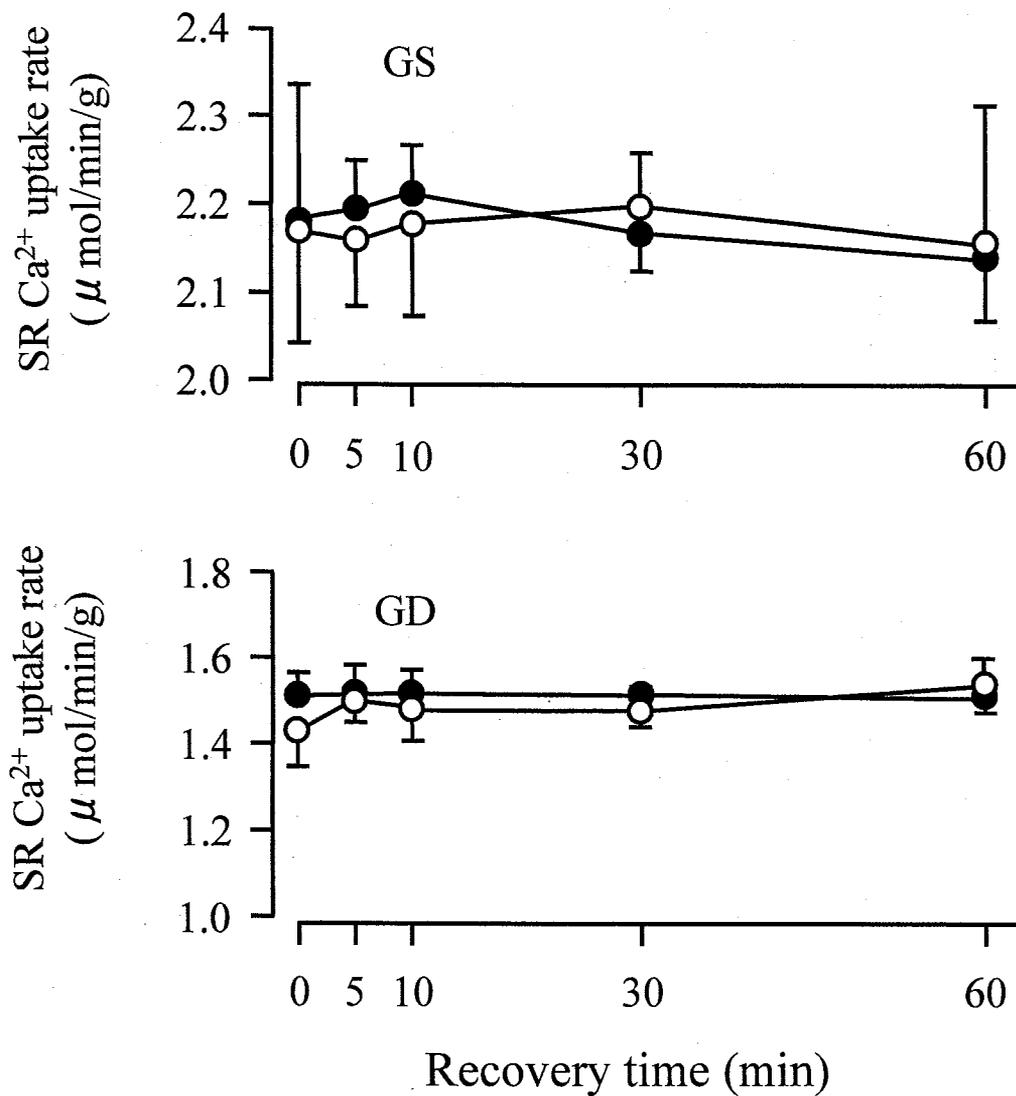


Fig. 9. Fatiguing contraction-induced changes in Ca²⁺ uptake rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE.

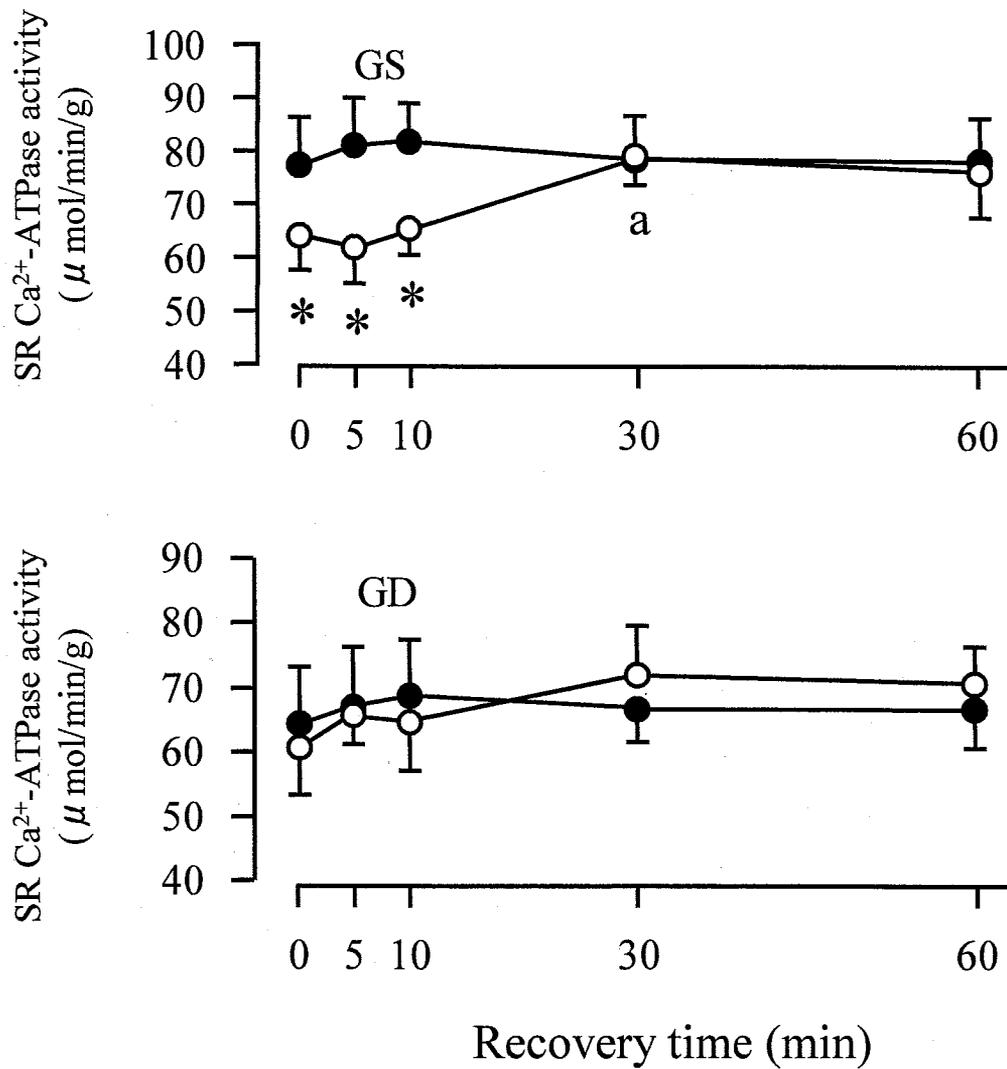


Fig. 10. Fatiguing contraction-induced changes in Ca²⁺-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means ± SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 5 min.

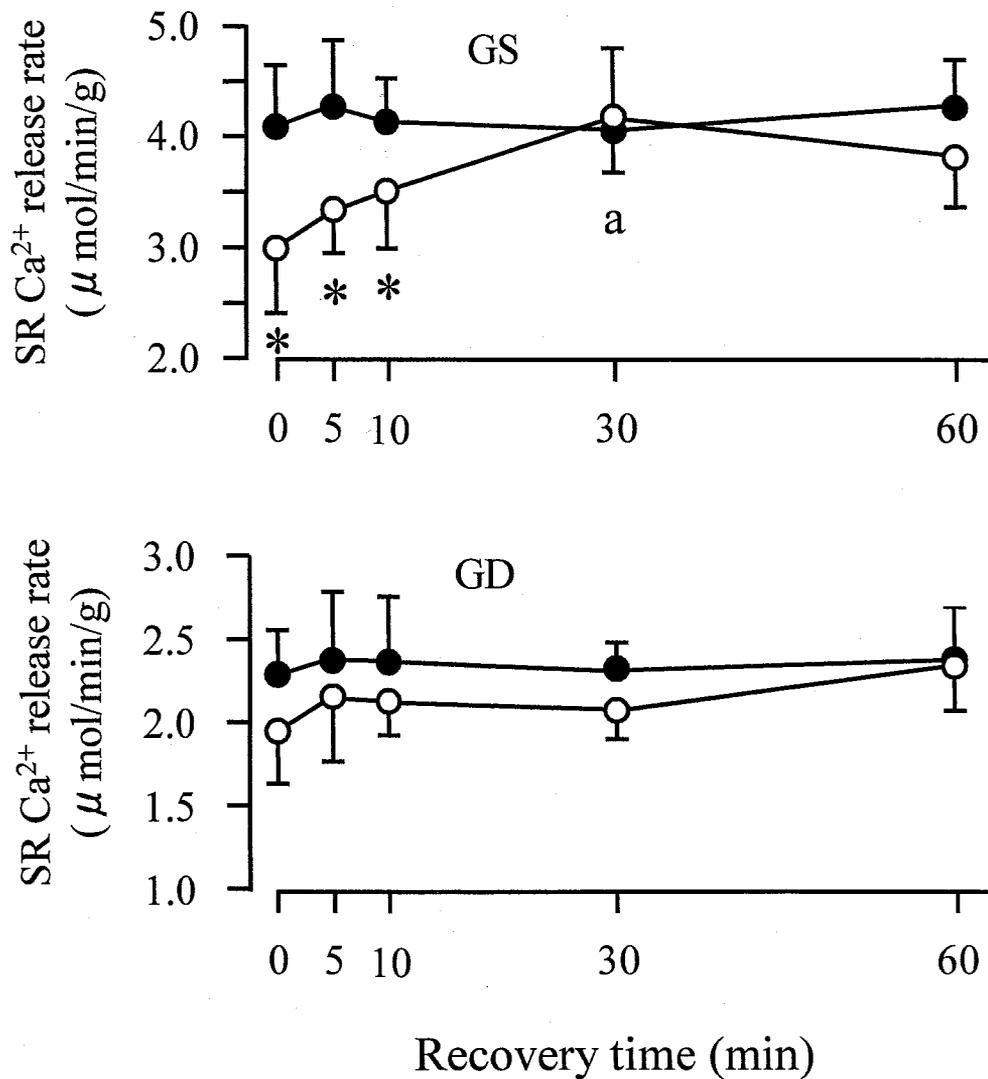


Fig. 11. Fatiguing contraction-induced changes in Ca²⁺ release rate of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial (GS) and deep (GD) regions of gastrocnemius of control (●) leg and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 0 min.

4. 考 察

Matsunaga et al. (2001) は、ラットの速筋に2日間連続して電気刺激を負荷した後の回復期のSRの機能について検討し、収縮によって低下したSR Ca²⁺-ATPase 活性が回復するのに約48時間を要すること、ならびに収縮直後では筋に含まれるSR Ca²⁺-ATPase のタンパク量が約30%低下することを報告している。これらの結果から彼らは、収縮直後活性値が低下したのは、収縮中に酵素タンパクの分解が亢進したためであり、活性値の回復に長時間を要したのは、酵素タンパクが再合成されるのにそれだけの時間が必要であったためであろうと推測している。本研究では、収縮活動直後に低下したGSのSR Ca²⁺-ATPase 活性は、収縮活動終了後30分で回復することが認められ (Fig. 10)、GSのSR Ca²⁺-ATPase は、タンパクの分解のような破壊的な傷害を受けなかったことが示唆される。走運動によって低下したSR Ca²⁺-ATPase 活性も、30~60分程度で回復することが報告されており (三島ら 2006)、本研究で用いた実験モデルで招来される細胞内環境の変化は、生理的条件に近いものであったと考えられる。

疲労した筋細胞では、安静時[Ca²⁺]_fが高まることが知られている (Carroll et al. 1999, Helander et al. 2002)。この現象には、細胞外部からCa²⁺が流入することと、SR Ca²⁺-ATPase 活性が低下することの2つが原因していると考えられている。T管に存在するDHPRはボルテージセンサーであり、活動電位を感知しSRのCa²⁺放出チャネルへそのシグナルを伝達する役割を担っている。安静時[Ca²⁺]_fが高い状態が継続すると、このシグナル伝達機能が低下する (Verburg et al. 2006)、あるいはCa²⁺依存性プロテアーゼが活性化され、Z線の分解や筋形質膜のイオンに対する透過性が増す (Lamb et al. 1995) などの変化が起こることが明らかになっている。したがって、収縮によって低下したSR Ca²⁺-ATPase 活性を早期に回復することは、筋の収縮機能を回復するだけでなく、細胞としての生命活動を維持するうえでも重要なことである。

カルボニル基は酸化されたアミノ酸において生成される物質であり、その含有量はタンパク酸化の程度を示す指標として一般に用いられている。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量が増加することが報告されている (Matsunaga et al. 2003)。また、SR Ca²⁺-ATPase の ATP 結合部位に、酸化に対し感受性の高いペプチドが存在すること (Viner et al. 1997)、さらに、収縮活動後に SR Ca²⁺-ATPase の ATP 結合部位の構造に変化が生じることなどから (Luckin et al. 1991)、収縮活動によって産生される ROS による修飾が、SR Ca²⁺-ATPase の活性が低下する素因の 1 つであると考えられている。Favero et al. (1998) による *in vitro* の実験は、ROS によって低下した SR Ca²⁺-ATPase 活性が還元型グルタチオンにより回復することを示している。したがって、収縮により低下した SR Ca²⁺-ATPase 活性の回復には、グルタチオンに代表される抗酸化物質の働きによって、酸化的修飾を受けた部位が復元することが関与している可能性がある。

また、筋グリコーゲン量の変化が、SR Ca²⁺-ATPase 活性の回復に関与している可能性もある。骨格筋内でグリコーゲン粒子は均一に存在しているわけではなく、多量に存在する部位とそうではない部位とがある (Friden et al. 1989)。SR は前者に当たる部位であり、SR の膜には多くのグリコーゲンが付着している (Lees et al. 2001)。近年、この SR に付着しているグリコーゲンが筋収縮に伴い減少すると、SR Ca²⁺-ATPase の ATP 結合部位の構造が変化し、そのためにこの酵素の活性が低下することが示唆されている (Lees et al. 2001)。このような SR Ca²⁺-ATPase の構造的な変化によって、SR Ca²⁺-ATPase 活性が低下したのであれば、収縮後の回復期にグリコーゲンが合成され、その量が収縮前のレベルに戻れば、ATPase 活性も回復することになる。

先行研究の多くでは、SR Ca²⁺-ATPase 活性と Ca²⁺取り込み機能とは、並行して変化することが示されているが、本実験では、収縮によって SR Ca²⁺-ATPase 活性は低下し

たが、SR Ca^{2+} 取り込み速度は変化しないことが観察された。また、実験 1 とは異なり、5 分間の収縮によって、GD の SR の機能には変化がみられず、これらの原因についてはよく分からない。先行研究の中には、筋収縮によって SR の機能が低下しないことを示すものもあり、わずかな実験条件の差異が異なった結果を生むのかもしれない。

5. 要 約

本実験では、Wistar 系雄性ラットを用い、収縮活動後の回復過程における筋小胞体 (SR) の機能の変化を経時的に検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し、坐骨神経に 2 秒に 1 回、75 Hz の電気刺激を 5 分間加え、刺激終了直後、刺激終了 5 分後、10 分後、30 分後および 60 分後に腓腹筋表層部 (GS) および腓腹筋深層部 (GD) を摘出し後の分析に用いた。電気刺激を加えた脚を実験 (Stim) 側、電気刺激を加えない反対脚をコントロール (Cont) 側として用いた。収縮活動前後の張力-頻度曲線、SR Ca^{2+} 取り込み速度、SR Ca^{2+} 放出速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性を測定し、次の結果を得た。

1. 5 分間の電気刺激による収縮活動によって、高頻度 (100 Hz) の強縮張力は収縮前と比べ約 60%にまで低下した。この張力は、10 分の安静により約 85%にまで回復した。一方、低頻度 (40 Hz) の強縮張力は、収縮により約 50%にまで低下し、60 分後に回復することが認められた。
2. SR Ca^{2+} 取り込み速度は、GS、GD のいずれも有意な変化を示さなかった。
3. SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、GS では収縮終了 10 分後まで、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。GD では、有意な変化は観察されなかった。

4. SR Ca^{2+} 放出速度は、GS では収縮終了 10 分後まで、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。GD では、有意な変化は観察されなかった。

以上の結果より、電気刺激による 5 分間の収縮活動後、GS では低下した SR Ca^{2+} -ATPase 活性および SR Ca^{2+} 放出速度の回復には、約 30 分の時間を要することが明らかとなった。また、GS と比べ GD では、電気刺激による変化の再現性が低い傾向にあることが認められた。

VI章 収縮活動後の回復期における筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の要因 (実験 3)

1. 目的

収縮活動に伴い SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下する成因としては、1) ROS によるタンパクの修飾 (Matsunaga et al. 2003), 2) ATP 結合部位の構造的な変化 (Leberer et al. 1987, Lukin et al. 1991) および 3) SR の膜に付着しているグリコーゲンの低減 (Lees et al. 2001) などが示されている。しかしながら、これらのことを示唆するいずれの報告も、収縮開始後のある一時期における筋の変化を検討したものである。したがって、SR Ca^{2+} -ATPase 活性と上記の 3 要因とが、みかけ上同期して変化したにすぎない可能性が残されている。もし、活性低下にこれらの要因が直接関与しているならば、筋疲労に至る過程あるいは筋疲労からの回復過程においても、活性とこれらの要因とは並行して変化するはずである。本研究の目的は、この点について検討し、これまで示されてきた要因が本当に SR Ca^{2+} -ATPase 活性低下の原因であるか否かを検証することである。

そのためには、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を把握する必要があり、実験 1 では収縮時、実験 2 では回復期における活性の経時的変化について検討した。その結果、GS では 5 分間の収縮により安定して活性が低下すること、また、収縮後 30 分間安静を保つことにより低下した活性が回復することが観察され、回復過程を用いれば、目的を達成できることが明らかになった。そこで本実験では、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化と活性影響を及ぼすとされる 3 要因との関連を、収縮後の回復期に着目して検討することを目的とした。

2. 方法

A. 被検動物および実験プロトコール

実験には、9週齢のWistar系雄性ラット48匹を用いた。水および飼料（日本クレア製飼育繁殖固形飼料CE-2）は自由摂取とし、12時間の明暗サイクルの照明下で室温を20°C~24°Cに常時維持した飼育室においてこれらを飼育した。8週齢時から飼育を始め、1週間の予備飼育の後、実験に供した。

電気刺激は、実験1と同様の方法を用いた。坐骨神経を介し、2秒に1回、5分間電気刺激を加え（矩形幅1 msec, 頻度75 Hz, トレイン幅100 msec）、収縮終了直後、収縮終了10分後および30分後にGSを摘出した。刺激を負荷した脚をStim側、刺激を加えない反対脚をCont側として用いた。

B. 被検筋、筋タンパクの抽出およびSRの精製

筋ホモジネートの方法は、実験1と同様であった。SRのマイクロソームは、Lees et al. (2001)の方法に従って作成した。摘出したGSを、氷で冷却した抽出液（20 mM HEPES, 20 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.2 % (mass/vol.) アジ化ナトリウム, pH 7.0）でよく洗浄し、はさみとナイフを用いてミンチ状に刻んだ。次にガラスホモジナイザーを用いて5倍（mass/vol.）の抽出液を加えてホモジナイズした。そのサンプルを5,000 Gで15分間遠心分離し上清を採取した。その後、600 mM 塩化カリウム（最終濃度）を含む抽出液を得られた上清と同量加え、5°Cで1時間攪拌した。その試料を60分間、225,000 Gで遠心分離しペレットを採取した。これに筋湿重量当たり0.33（mass/vol.）倍の溶液（150 mM 塩化カリウム, 20 mM HEPES, 20 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.2 % (mass/vol.) アジ化ナトリウム, pH 7.0）を加えて、ガラスホモジナイザーでホモジナイズした。得られたマイクロソームに含まれるタンパク濃度は、Bradford (1976)の方法で測定した。なお、筋ホモジネートおよびSRのマイクロソームは、採取できる筋

量の関係から、2匹から得られた筋をひとつにまとめ、1検体として処理した。

C. 分析項目

c-1. SR Ca²⁺-ATPase 活性

SR Ca²⁺-ATPase 活性値は、実験 1 と同様の方法を用い測定した。

c-2. グリコーゲンフォスホリラーゼ含有量

SR Ca²⁺-ATPase および GP の分離には、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 (SDS-PAGE) 法を用いた。SR の精製によって得られたマイクロソームを希釈溶液 (62.5 mM トリス/塩酸, 2% (mass/vol.) SDS, 10% (vol./vol.) グリセロール, 5% (vol./vol.) 2-メルカプトエタノール, 0.02% (mass/vol.) プロモフェノールブルー, pH 6.8) でタンパク濃度が 1 mg/ml になるように希釈した。セパレイティングゲルの組成は、10% (mass/vol.) アクリルアミド, 0.1% (mass/vol.) ビスアクリルアミド, 200 mM トリス/100 mM グリシン (pH 8.6), 5% (vol./vol.) グリセロール, 0.4% (mass/vol.) SDS, 0.1% (vol./vol.) TEMED, 0.05% (mass/vol.) 過硫酸アンモニウムであった。60 V で 15 時間 (5°C) 通電した後、クーマシーブリリアントブルー染色を行った。ゲルの写真をスキャナーでコンピューターに取り込み、マイクロソームに含まれる GP の量を測定した。なお、GP の量は、SR Ca²⁺-ATPase に対する相対値で表した。

c-3. カルボニル量

20 mM 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンと反応させたマイクロソーム (タンパク 13 µg を含有) の含まれるサンプルを、上述の SDS-PAGE により分画した後 (Klebl et al.

1998), ニトロセルロース膜に転写した (Towbin et al. 1979). 5,000 倍に希釈した抗ジニトロフェニル抗体 (シグマ社) を一次抗体, 30,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ (シグマ社) を二次抗体として用い, タンパクと反応させた後, CSPD (ペリンガー社) を用い発光させた. この発光は, アルカリフォスファターゼが CSPD を基質として反応を起こす際, 化学的発光を生じることを利用したものである. この発光を X 線フィルムに感光させ, スキャナーでコンピューターに取り込み, SR Ca²⁺-ATPase に含まれるカルボニル量を測定した. この結果を基に, 収縮直後の Cont 側の平均値を 100%とした相対値で, SR Ca²⁺-ATPase に含まれるカルボニル量を示した.

c-4. SR に付着するグリコーゲン量

SR に付着するグリコーゲン量は, Lees and Williams (2004) の方法に従って測定した. 174 mM 酢酸, 8.7 U/ml グルコアミラーゼ (GA), 43 mM 炭酸水素カリウム (pH 4.8) からなる溶液 0.5 ml 中で, ミクロソーム (タンパク 50 µg を含有) を 40°C で 2 時間インキュベートし, グリコーゲンを加水分解した. その後, 反応溶液 (50 mM トリス/塩酸, 1 mM 塩化マグネシウム, 0.5 mM DTT, 0.3 mM ATP, 0.05 mM NADP, 0.07 U/ml グルコース-6 リン酸脱水素酵素, 0.17 U/ml ヘキソキナーゼ, pH 7.5) にインキュベートしたサンプルを 20 µl 加えた. 暗所に 1 時間放置した後, 分光蛍光光度計 (島津製作所 RF-5000) を用い, 蛍光値を測定した (励起波長 340 nm, 蛍光波長 460 nm).

c-5. FITC 結合量

SR Ca²⁺-ATPase に結合する FITC の量は, Favero et al. (1998) の方法に従って測定した. 反応溶液 (50 mM トリス/塩酸, 250 mM サッカロース, 0.1 mM 塩化カル

シウム, 5 mM 塩化マグネシウム, 0.05 mM FITC, pH 8.8) 中で, タンパク 30 μ g を含むマイクロソームを室温で 1 時間インキュベートした. その後, 停止溶液 (100 mM トリス/塩酸, 250 mM サッカロース, 5 mM Na_2ATP , pH 6.8) を加え反応を止め, 前述の SDS-PAGE 法を用いタンパクを分離した. 紫外線を照射し撮影したゲルの写真をスキャナーでコンピューターに取り込み, SR Ca^{2+} -ATPase に含まれる FITC の量を測定した. この結果を基に, 収縮直後の Cont 側の平均値を 100% とした相対値で, SR Ca^{2+} -ATPase に含まれる FITC 結合量を示した.

D. 統計処理

統計量は, 平均 \pm 標準誤差で示した. Cont 側と Stim 側との差異の検定には, 対応のある Student's t-test を用いた. また, 回復時間による変化の差異を検討するため, 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% 未満とした.

3. 結果

A. SR Ca^{2+} -ATPase 活性

Fig. 12 に, SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を示した. 収縮終了直後に Cont 側に対し Stim 側が有意な低値を示したが, 収縮終了 10 分後および 30 分後では両群間に有意な差異は認められなかった. また, Stim 側間での比較では, 収縮終了直後と収縮終了 30 分後の間に有意な差異が認められた.

B. カルボニル量および FITC 量

カルボニル量は, 収縮終了直後および収縮終了 30 分後において, Cont 側に対し Stim

側で有意な高値が (Fig. 13), また FITC 量については, 収縮終了直後および 30 分後において, Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が観察された (Fig. 14).

C. グリコーゲンフォスホリラーゼおよびグリコーゲン量

GP の量は, 収縮終了直後および 10 分後において, Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が, また Cont 側間の比較では, 収縮終了直後に対し 30 分後で有意な低値が認められた (Fig. 15). SR に付着するグリコーゲン濃度は, GP の変化と類似した変化を示した (Fig. 16). 収縮終了直後および 10 分後において, Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が, また Cont 側間の比較では, 収縮終了直後に対し 10 分後および 30 分後で有意な低値が観察された.

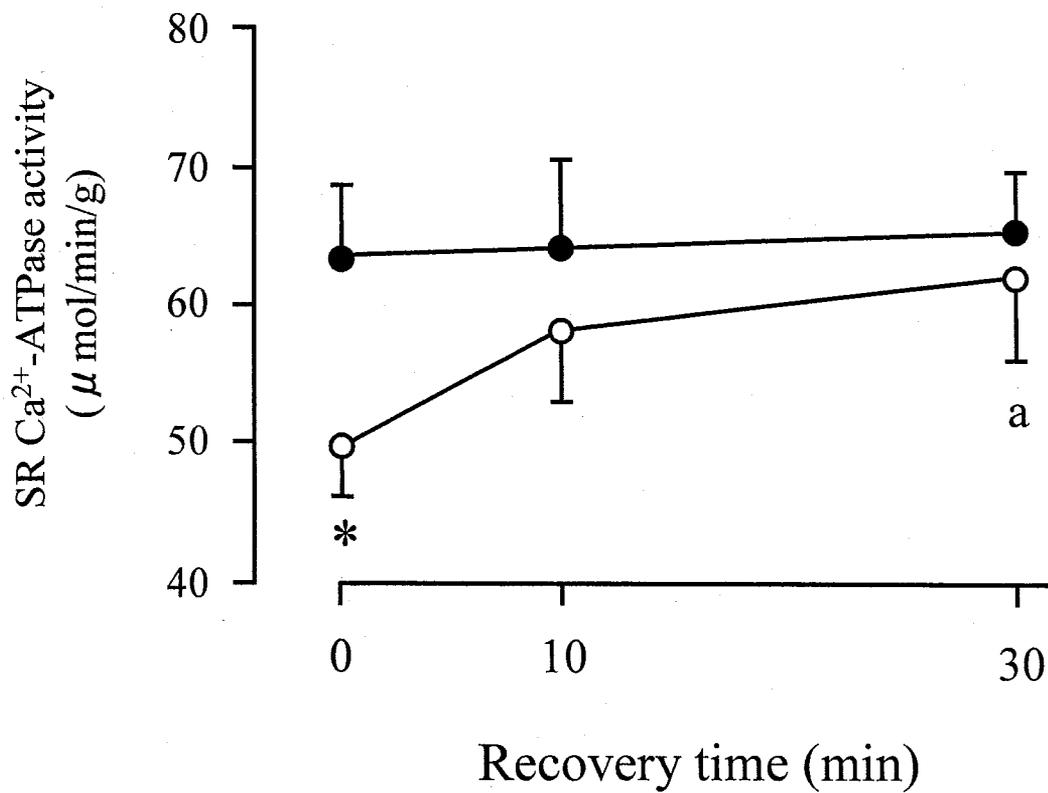


Fig. 12. Fatiguing contraction-induced changes in Ca²⁺-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means ± SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 0 min.

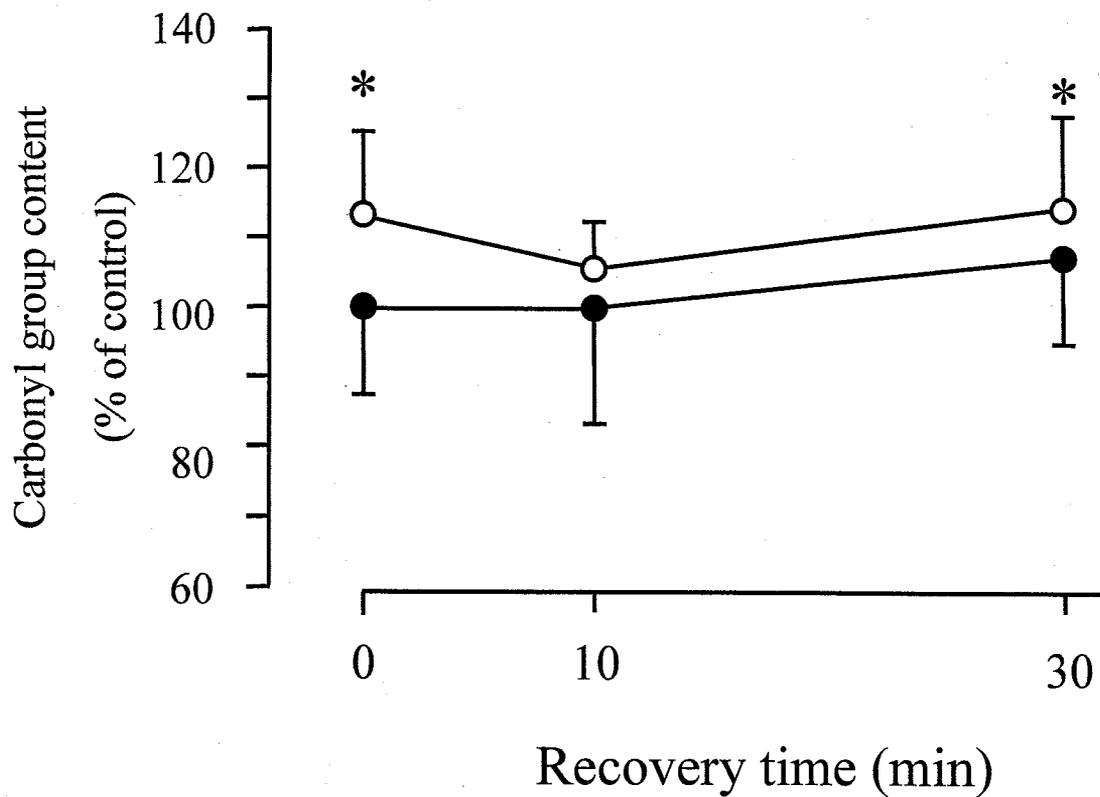


Fig. 13. Densitometric evaluation of anti-2, 4-dinitrophenylhydrazine - reactive carbonyl groups of sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control.

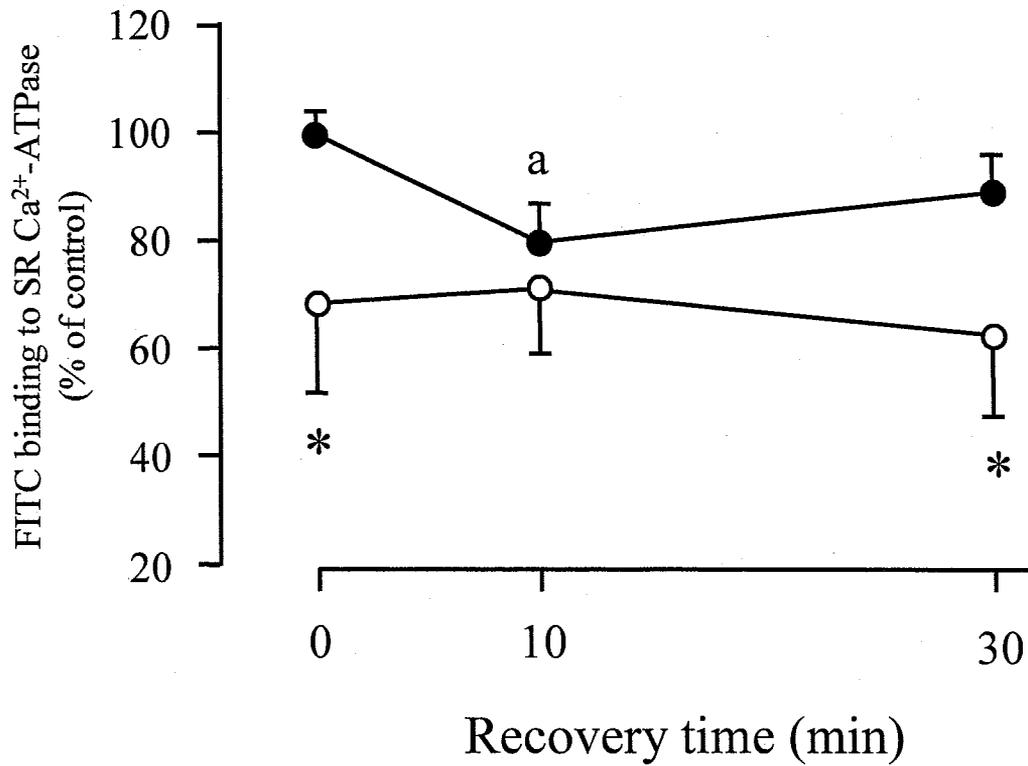


Fig. 14. Densitometric evaluation of FITC binding to sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 0 min.

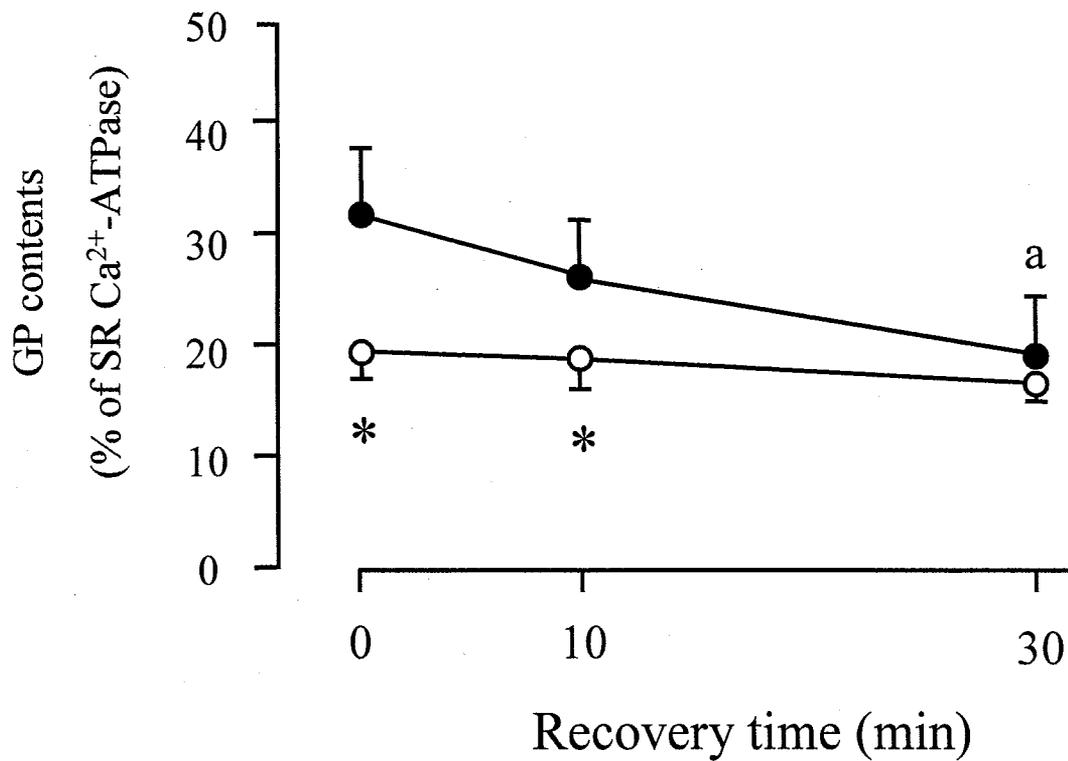


Fig. 15. Densitometric evaluation of glycogen phosphorylase (GP) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 0 min.

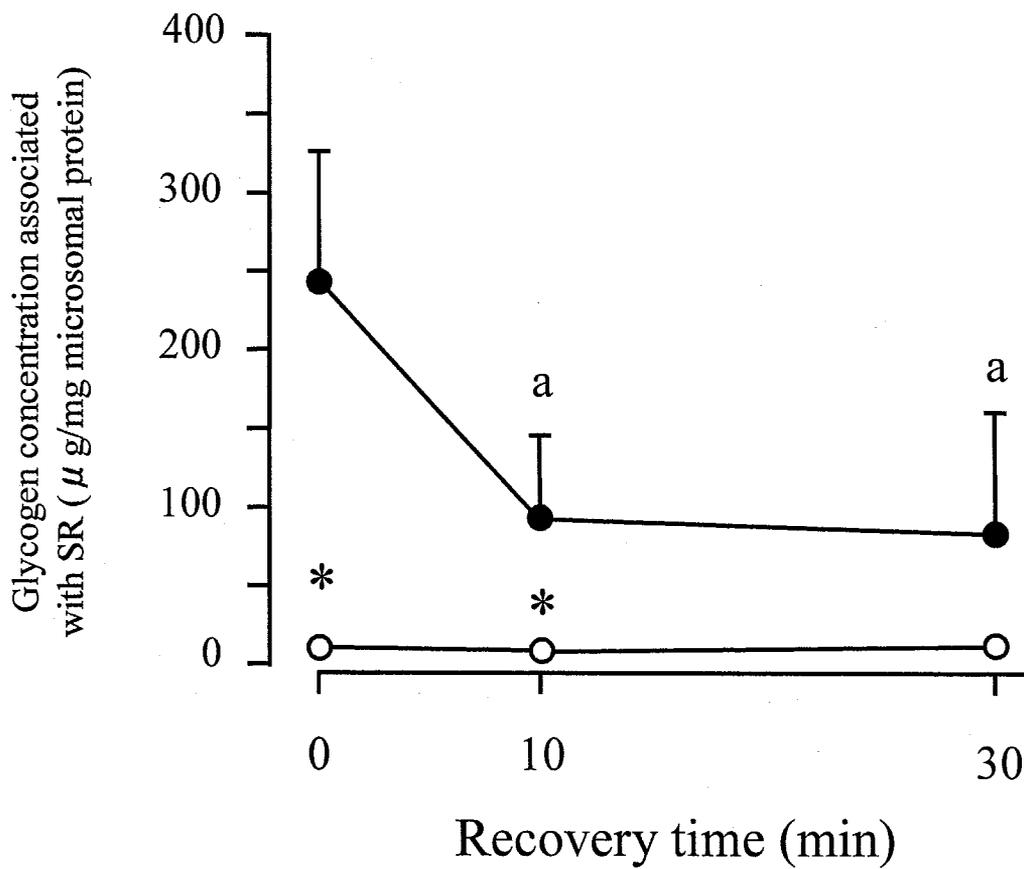


Fig. 16. Glycogen concentration associated with sarcoplasmic reticulum (SR) in the superficial region of gastrocnemius of control (●) and stimulated (○) legs at different time points. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control. ^a $P < 0.05$ vs 0 min.

4. 考 察

収縮終了直後に、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下および SR Ca^{2+} -ATPase のカルボニル含有量の増加が認められ、これは数日間にわたる電気刺激後 (Matsunaga et al. 2001) あるいは疲労困憊に至る運動後について検討した報告 (Matsunaga et al. 2003) と一致する結果である。Klebl et al. (1998) は、これらの知見から、収縮に伴って発生する ROS が、SR Ca^{2+} -ATPase タンパクを修飾することが、この酵素の活性が低下する素因であろうと述べている。しかしながら本実験では、収縮終了 30 分後では、カルボニルの量は増加しているにもかかわらず、SR Ca^{2+} -ATPase 活性は安静時の値まで回復していることが観察され、これら 2 つの間に因果関係が存在する可能性は低いことが示唆された。

FITC は、SR Ca^{2+} -ATPase の ATP 結合部位を構成するリシン残基に特異的に結合する試薬であり、この部位の構造的な変化の検討に古くから用いられてきた。SR Ca^{2+} -ATPase の ROS への曝露 (Favero et al. 1998)、または激しい収縮活動 (Luckin et al. 1991) によって活性が低下した SR Ca^{2+} -ATPase では、FITC の結合量が低減することが知られており、ATP 結合部位を構成するアミノ酸が修飾を受けることが、活性低下の一因であるとされてきた。しかしながら本実験では、カルボニル含有量と同様、FITC 結合量は SR Ca^{2+} -ATPase 活性と同期して変化しないことが認められ、ATP 結合部位の構造的な変化も SR Ca^{2+} -ATPase 活性低下の直接の原因でないことが示された。

1967 年の Bergström et al. に始まる一連の研究により、長時間運動による筋疲労が筋グリコーゲンの枯渇によって招来されることが明らかにされたが、そのメカニズムについては依然として解明されていない。グリコーゲンが枯渇すると、トリカルボン酸サイクルへのアセチル CoA の供給量が低下し、そのために酸化的リン酸化による ATP 産生が阻害されることが考えられる。しかしながら、グリコーゲンが枯渇した筋細胞内の

ATP の濃度は最大でも 30%程度しか低下しておらず、この程度の低下率では細胞内に存在する ATPase の活性は影響を受けない。したがって、筋グリコーゲンの枯渇に起因して筋疲労が起こるのは、グリコーゲンの持つエネルギー源以外の役割を介しているものと思われる。

近年、グリコーゲンが、SR の構造を保持する役割を担っていることが示されている。SR の膜には、グリコーゲンが結合しており（以後、SR グリコーゲンと呼ぶ）、その SR グリコーゲンに GP が結合している (Lees et al. 2001)。十分な量の GP が膜上に存在しているときは、SR の構造は正常に保たれるが、収縮活動により SR グリコーゲンが消費され GP が SR から解離すると、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下すると考えられている。本実験ではこの仮説を検証するために、SR グリコーゲンおよび GP の変化についても検討した。Figs. 15 および 16 に示されるように、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が回復した運動終了 30 分後では、SR グリコーゲン量、GP 量の両方に Stim 側と Cont 側間に差異はみられなかった。しかしながら、これは Stim 側の両パラメーターが回復期に伴って増加したためではなく、Cont 側の値が低下したためである。Cont 側でこのような低下が生じた理由はよく分からない。少なくとも活性が回復した Stim 側で、両パラメーターに変化がみられなかったことから、これらが SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響している可能性は低いと考えられる。

5. 要 約

本実験では、Wistar 系雄性ラットを用い、収縮活動後の回復過程における、筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 依存性 ATPase (SR Ca^{2+} -ATPase) 活性の変化の要因について検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し、坐骨神経に 2 秒に 1 回、75 Hz の電気刺激を 5 分間加え、刺激終了直後、刺激終了 10 分後および 30 分後

に腓腹筋表層部を摘出し後の分析に用いた。電気刺激を加えた脚を実験 (Stim) 側, 電気刺激を加えない反対脚をコントロール (Cont) 側として用いた。摘出した筋から, SR Ca^{2+} -ATPase 活性, SR Ca^{2+} -ATPase に含有されるカルボニル基の量, SR に付着するグリコーゲン (SR グリコーゲン) とグリコーゲンフォスホリラーゼ (GP) の量および SR Ca^{2+} -ATPase に結合する fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合量を測定し, 次の結果を得た。

1. SR Ca^{2+} -ATPase 活性は, 収縮終了直後および 10 分後において, Cont 側と比べ Stim 側で有意な低値が, また, Stim 側間での比較では, 収縮終了直後に対し 30 分後の方で有意な高値が認められた。
2. SR Ca^{2+} -ATPase のカルボニル含有量は, 収縮終了直後および収縮終了 30 分後において, Cont 側と比べ Stim 側で有意な高値が認められた。
3. FITC 結合量は, 収縮直後および刺激終了 30 分後において, Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が観察された。
4. SR グリコーゲン量および GP 量は, 収縮直後および刺激終了 10 分後において, Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。

以上の結果より, 収縮活動の回復過程において, SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化とタンパクの酸化および ATP 結合部位の構造的変化との間に, 関連性がないことが示唆された。

Ⅶ章 グリコーゲンの減少が筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能およびその構造に及ぼす影響 (実験 4)

1. 目的

Cuenda et al. (1991) は, SR Ca^{2+} -ATPase に GP を添加すると, ATP 結合部位の構造が変化し, 酵素の ATP に対する親和性が増すことを, in vitro の研究結果から報告している. このような変化は, SR Ca^{2+} -ATPase 活性を増加させるよう作用すると考えられる. 前述のように, 筋中グリコーゲンの一部は SR の膜に付着し (以後 SR グリコーゲンと呼ぶ), さらに GP はこの SR グリコーゲンに付着することで, SR に結合していると考えられている (Lees et al. 2001). このような構造的特性のため, 筋収縮中, GP によって SR グリコーゲンが分解されると, GP は SR から必然的に解離することになる. Cuenda et al. (1991) の結果からは, GP の解離は SR Ca^{2+} -ATPase の機能にマイナスの影響を与えると推測される.

実験 3 では, SR グリコーゲンおよび GP が SR Ca^{2+} -ATPase 活性に及ぼす影響を検証した. その結果, 収縮後の回復期間中に, SR Ca^{2+} -ATPase 活性は安静時のレベルに回復するが, SR に含まれる GP は減少したままであることが明らかとなり, GP は SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を及ぼさないと推測された. しかしながら, 回復期間中に, 刺激を加えない筋において GP が変化したこと, および GP の減少の程度が必ずしも高くなかったことを考慮すると, 実験 3 の結果のみから, GP の作用について明確な結論をくだすことは, 適切ではないと考えられる.

そこで実験 4 では, SR グリコーゲンおよび GP が SR Ca^{2+} -ATPase に及ぼす影響をさらに明確にするために, GA を用い, SR グリコーゲンを分解し, SR Ca^{2+} -ATPase の機能およびその構造の変化を検討した.

2. 方 法

A. 被検動物

実験には、250～260 g の Wistar 系雄性ラットを用いた（各群 n = 6）。水および飼料（日本クレア製飼育繁殖固形飼料 CE-2）は自由摂取とし、12 時間の明暗サイクルの照明下で室温を 20°C～24°C に常時維持した飼育室においてこれらを飼育した。

B. 被検筋および SR の精製

被検動物を麻酔下に置いた後、両脚の後肢骨格筋の速筋を摘出した。SR のマイクロソームは、実験 3 の方法を一部修正して作成した。摘出した筋を、5 倍 (mass/vol.) の抽出液 (20 mM HEPES, 20 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.2 % (mass/vol.) アジ化ナトリウム, pH 7.0) を加えてホモジナイズし、5,000 G で 15 分間遠心分離し上清を採取した。その後、この上清を実験 (Exp) 群とコントロール (Cont) 群に等分した。Exp 群には 600 mM 塩化カリウム (最終濃度) とグリコーゲン分解酵素の一種である GA を 17.4 U/ml 加えた抽出液, Cont 群には 600 mM 塩化カリウムのみ加えた抽出液を上清と同量加え、5°C で 1 時間攪拌した。その試料を 60 分間、225,000 G で遠心分離しペレットを採取した。これに筋湿重量当たり 0.33 (mass/vol.) 倍の溶液 (150 mM 塩化カリウム, 20 mM HEPES, 20 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.2 % (mass/vol.) アジ化ナトリウム, pH 7.0) を加えて、ガラスホモジナイザーでホモジナイズした。このサンプルを直ちに液体窒素で冷却し-80°Cで保存し、後の分析に供した。

C. 分析項目

c-1. SR グリコーゲン量

SR グリコーゲン量は，実験 3 と同様の方法で測定した。

c-2. SR Ca²⁺-ATPase およびグリコーゲンフォスホリラーゼ含有量

ミクロソームに含まれる SR Ca²⁺-ATPase および GP の量は，実験 3 と同様，SDS-PAGE を用い測定した。

c-3. SR Ca²⁺-ATPase 活性

SR Ca²⁺-ATPase 活性値は，実験 1 と同様の方法を用い，ミクロソーム（タンパク 10 μg を含有）から測定した。また，SR Ca²⁺-ATPase の ATP に対する親和性を検討するために，0.04 mM，0.1 mM，0.5 mM，1 mM，2 mM および 4 mM の 6 種類の ATP 濃度で活性値の測定を行なった。ATP に対する親和性は，SR Ca²⁺-ATPase の最大活性の 50%が得られる ATP 濃度で示した。

c-4. FITC 結合量

SR Ca²⁺-ATPase に結合している FITC の量は，実験 3 と同様の方法を用い測定した。

D. 統計処理

統計量は，平均±標準誤差で示した。Cont 群と Exp 群との差異の検定には，対応のある Student's t-test を用いた。なお，有意水準は 5%未満とした。

3. 結果

A. SR グリコーゲン量

Fig. 17 に，GA 処理が SR グリコーゲン量に及ぼす影響を示した。処置により SR グ

リコーゲン量は著しく減少し、Cont 群に対する Exp 群の値は 5.9%であった。

B. SR Ca²⁺-ATPase およびグリコーゲンフォスホオリラーゼ含有量

GA 処理によって、ミクロソームに含まれる SR Ca²⁺-ATPase のタンパク量に変化は認められなかった (Fig. 18)。一方、GP 含有量は GA 処理の影響を大きく受け、Cont 群に対して Exp 群の含有量は 29.8%であった。

C. FITC 結合量

SR Ca²⁺-ATPase に結合する FITC の量は、GA 処理によって有意に増加することが示され、Cont 群に対し Exp 群は 41.5%高い値を示した (Fig. 19)。

D. SR Ca²⁺-ATPase 活性および ATP に対する親和性

GA 処理によって FITC 結合量が増加したことから、SR Ca²⁺-ATPase 活性の最大値、ATP に対する親和性のどちらか一方あるいは両方が増加すると予想された。しかしながら、どちらのパラメーターにも変化は観察されなかった (Fig. 20)。

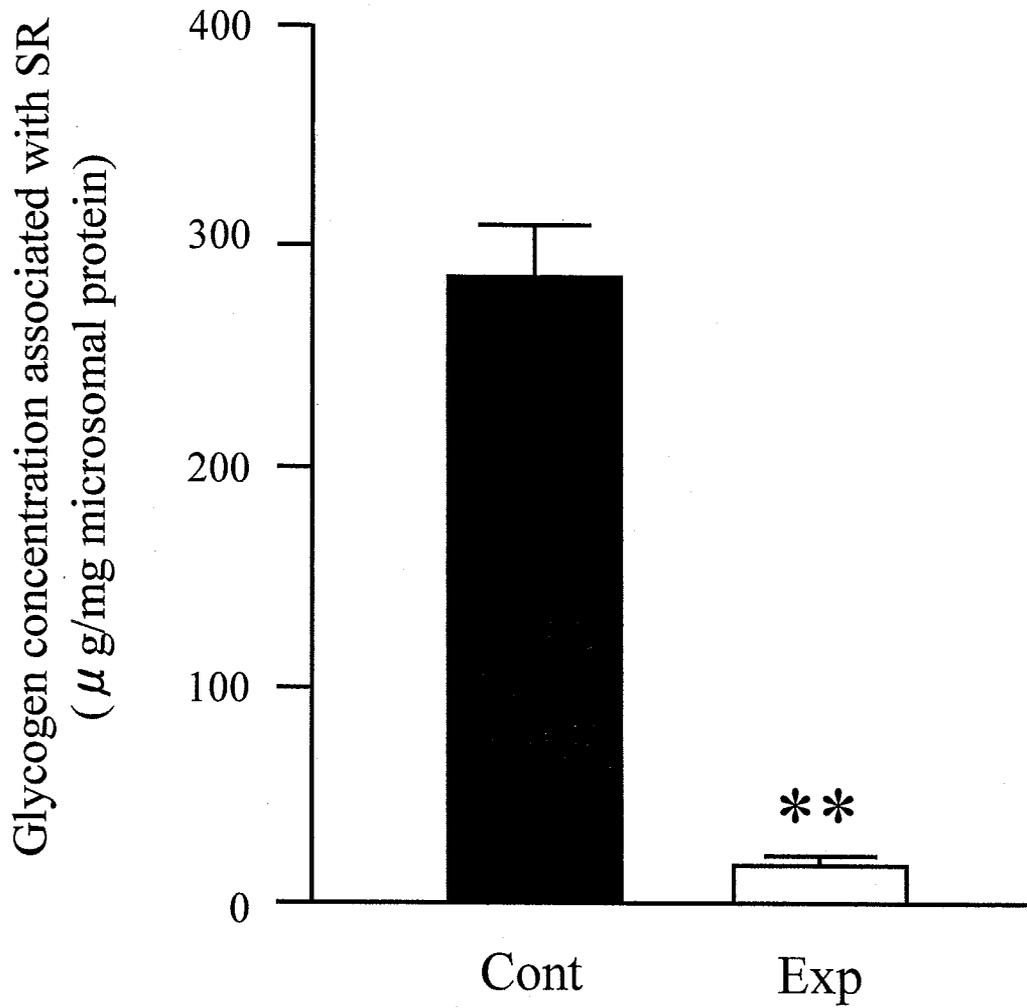


Fig. 17. Glycogen concentration associated with sarcoplasmic reticulum (SR) for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Values are means \pm SE. ** $P < 0.01$ vs control.

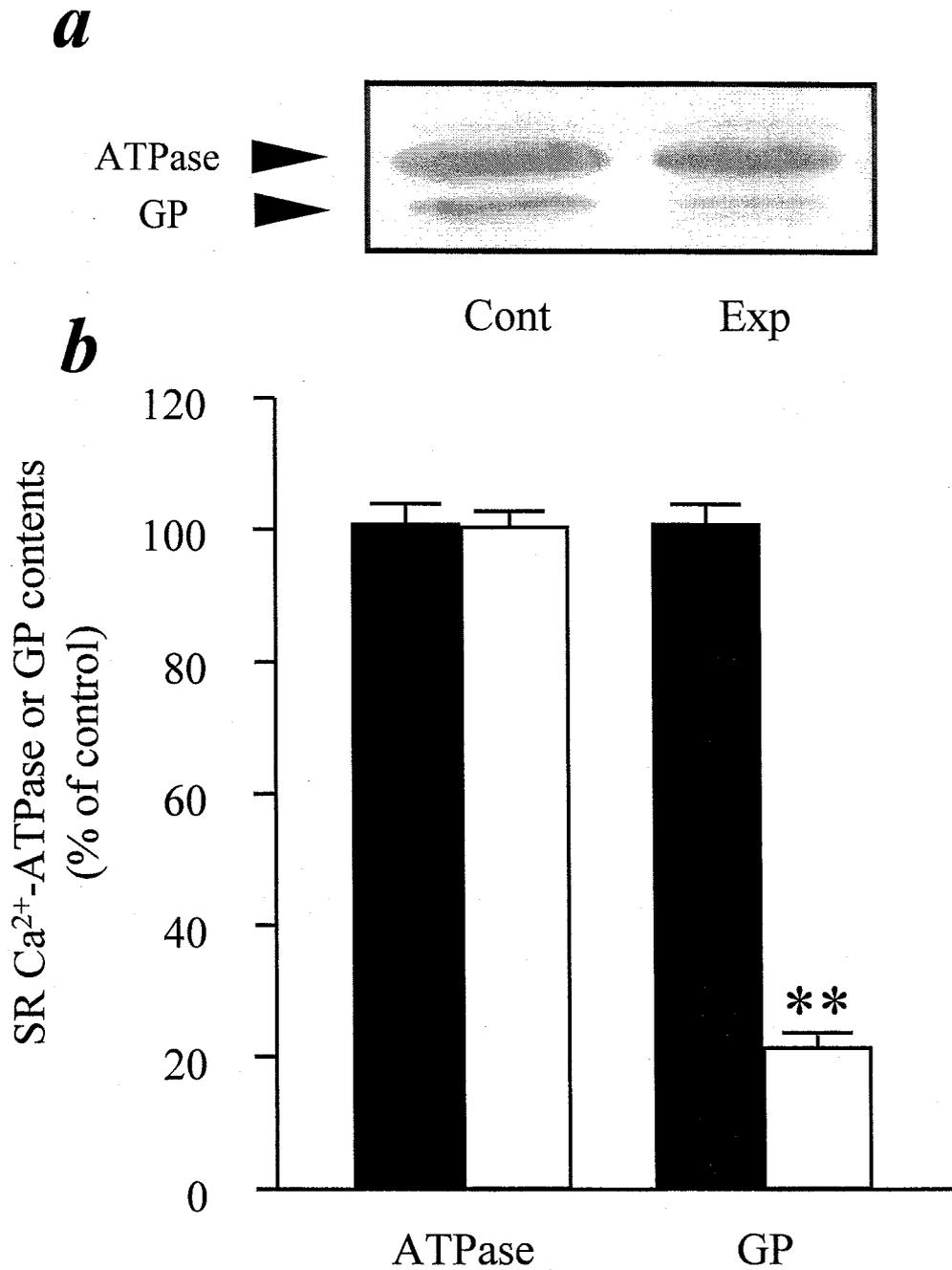


Fig. 18. Electrophoretic separation of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum (SR) and glycogen phosphorylase (GP) (a) and their contents (b) in microsomal fractions for control (*solid bars*) and glycogen-extracted (*open bars*) conditions. Values are means \pm SE. ** $P < 0.01$ vs control.

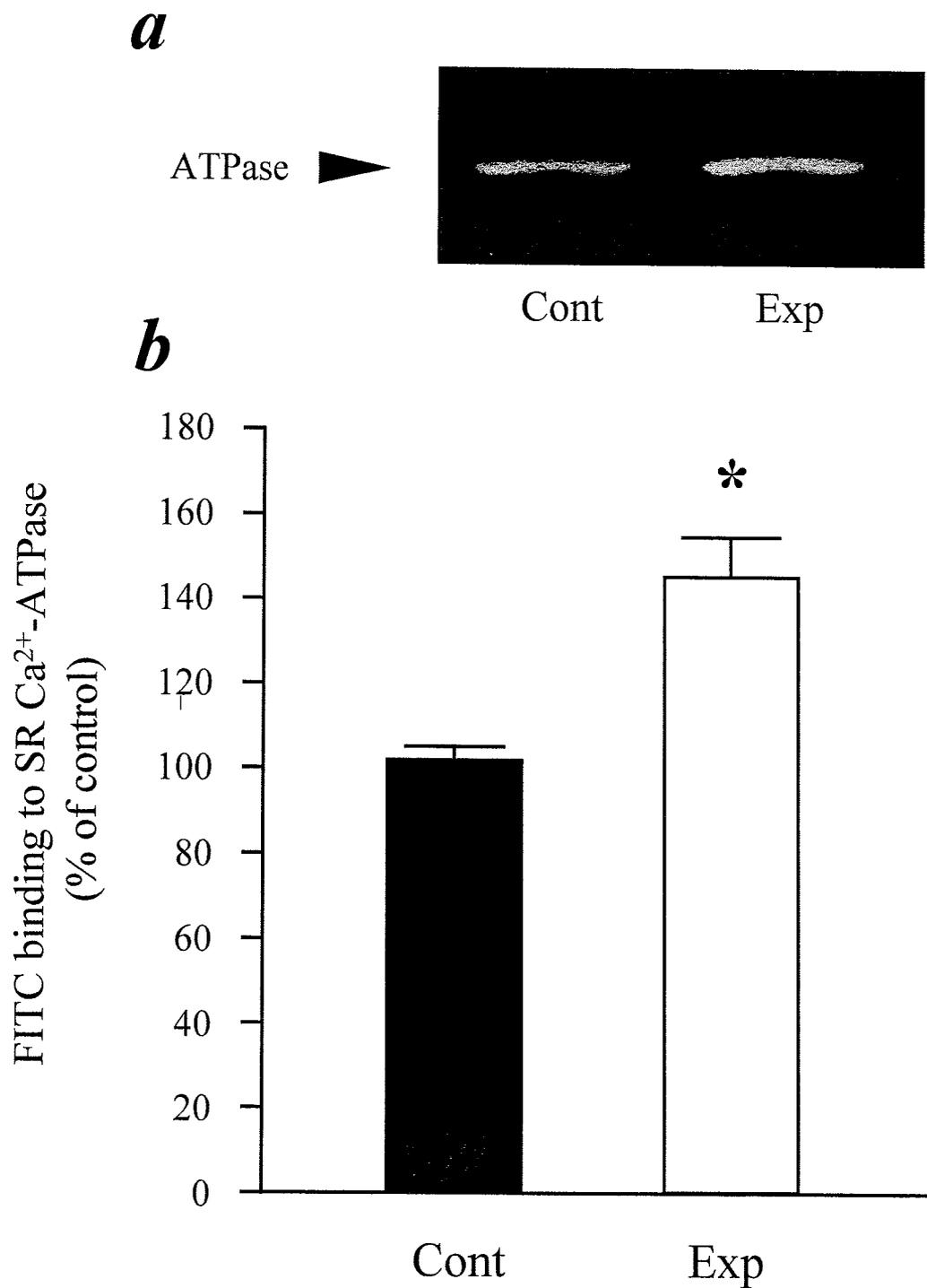


Fig. 19. Electrophoretic of FITC-labeled sarcoplasmic reticulum(SR) Ca²⁺-ATPase(a) and densitometric evaluation of FITC binding (b) for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Values are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs control.

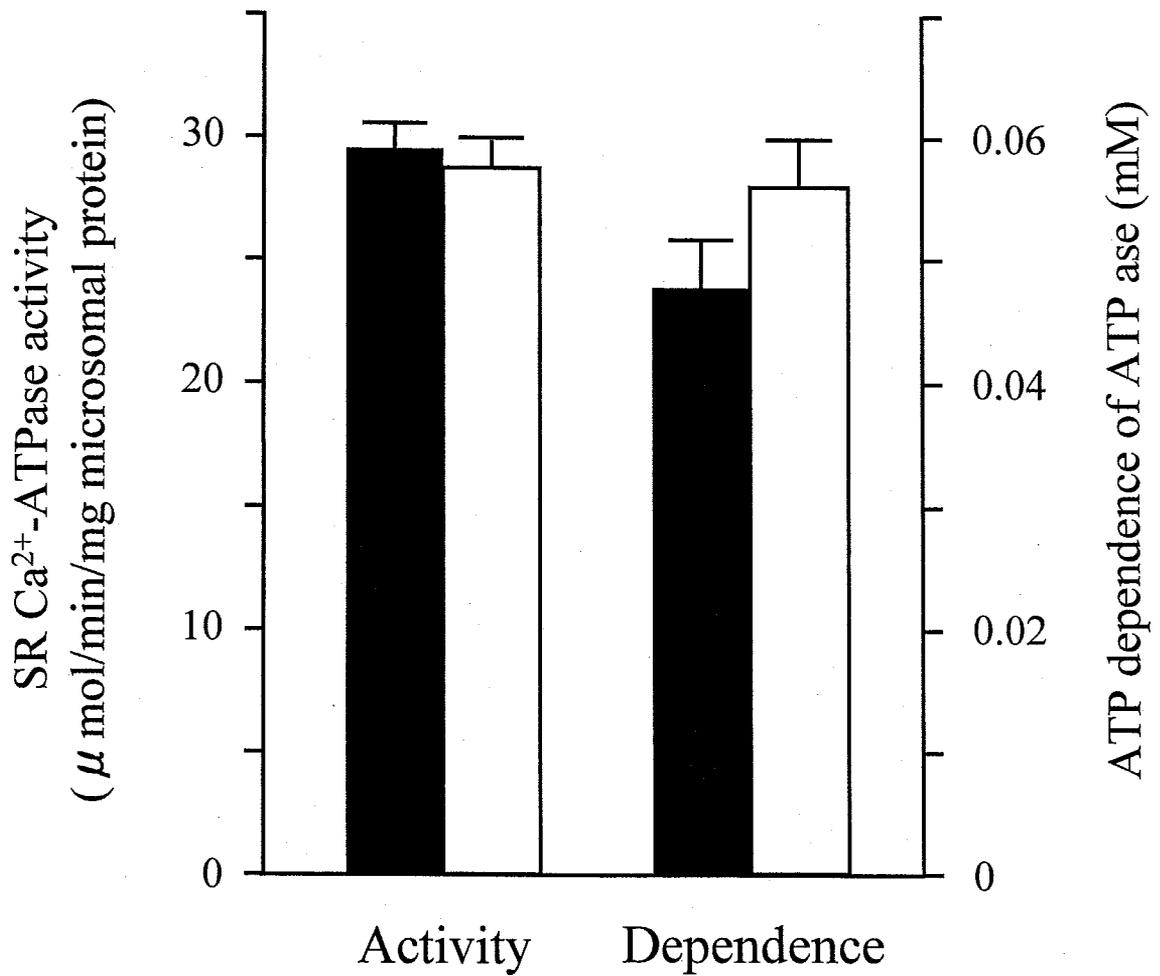


Fig. 20. Ca²⁺-ATPase activity of sarcoplasmic reticulum (SR) and ATP dependence of SR Ca²⁺-ATPase for control (*solid bars*) and glycogen-extracted (*open bars*) conditions. Values are means \pm SE.

4. 考 察

最大酸素摂取量の 60~85%に相当する運動強度においては、筋疲労と筋グリコーゲンの枯渇との間に密接な関連があることが、1960 年代の後半から 1970 年代の前半に行われた一連の実験によって明らかにされた (Ahlborg et al. 1967, Bergström et al. 1967, Karlsson and Saltin 1971). その後、多くの研究者がグリコーゲンの枯渇が筋疲労を誘起するメカニズムを解明しようとしたが、現在の段階でもなお明確になっているとはいえない。

先行研究によって、1) 筋収縮に伴う SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下には、FITC 結合量の低下が付随する (Leberer et al. 1987, Luchin et al. 1991), 2) SR グリコーゲンの量が減少すると、膜に付着している GP が SR から解離する (Lees et al. 2001), 3) SR 膜に付着する GP の量を増加させると、FITC の結合量が増加する (Cuenda et al. 1991) ことなどが報告されており、これらの知見から、SR グリコーゲンが減少すると、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下あるいは SR Ca^{2+} -ATPase の ATP に対する親和性の変化が誘起されることが推測されてきた。

しかしながら本実験の結果は、SR グリコーゲンおよび GP は、SR Ca^{2+} -ATPase 活性に全く影響しないことを明示するものである。また、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が変化しないにもかかわらず、酵素に結合する FITC の量は増加することも認められた。激しい筋収縮が負荷された筋では、FITC の結合量と SR Ca^{2+} -ATPase 活性とが同期して低下することから、活性の低下は ATP 結合部位の構造の変化に起因して起こると考えられてきた (Leberer et al. 1987, Luchin et al. 1991)。しかしながら、実験 3 および本実験の結果は、これを否定するとともに、FITC 結合量の測定は、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の要因を探る手法としては、適切な実験方法ではないことを示唆する。

グリコーゲンは、SR の膜のみならず T 管にも大量に付着しており、この部位の構造

的特性に影響を及ぼしていると考えられている (Lees et al. 2001). Chin and Allen (1997) および Helander et al. (2002) は、この部位のグリコーゲンが減少すると、DHPR から SR の Ca^{2+} 放出チャネルへのシグナル伝達に不全が生ずるか、放出チャネル自身の機能が低下するかの変化が生ずることが、グリコーゲンの枯渇が筋疲労を誘因するメカニズムではないかと述べている。しかしながらこれは、単一筋線維を用い張力や細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した研究結果からの推測であり、今後、直接的な検証を行う必要がある。また、活動電位の伝導に重要な役割を担う $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ は、主として解糖によって産生される ATP をその活動に利用することが報告されており (Okamoto et al. 2001), グリコーゲンが筋機能に影響を及ぼす他の部位としては筋形質があげられる。

5. 要 約

本研究では、筋小胞体 (SR) 付着するグリコーゲン (SR グリコーゲン) が、SR $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ の構造および SR $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性に影響を検討することを目的とした。ラットの後肢骨格筋の速筋を摘出し、SR を精製する過程で、グリコーゲン分解酵素であるグルコアミラーゼ (GA) で処理し、後の分析に供した。GA の処理を行なう群を実験 (Exp) 群、行なわない群ををコントロール (Cont) 群として、SR グリコーゲン量、ミクロソームに含まれるグリコーゲンフォスホリラーゼ (GP) の量、SR $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ への fluorescein isothiocyanate (FITC) の結合量および SR $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性を測定し、以下の結果を得た。

1. GA 処理によって、Cont 群に対し Exp 群では、SR グリコーゲンは 5.9%、GP 含有量は 29.8% に減少した。

2. GA 処理によって、Cont 群に対し Exp 群では、FITC 結合量は 41.5% の高値が認められた。
3. GA 処理によって、SR Ca^{2+} -ATPase 活性および ATP に対する酵素の親和性には変化は認められなかった。

以上の結果から、SR グリコーゲンおよび GP の減少は、SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を及ぼさないことが示唆された。

Ⅷ章 討 論

19 世紀後半に、イギリスの生理学者 Ringer (1883) によって心筋の収縮に Ca^{2+} が必須であることが、また 20 世紀初頭には、骨格筋においても心臓と同様であることが明らかにされた (Kamada and Kinoshita 1943, Heilbrunn and Wiercinsky 1947). さらに、筋細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は SR によって制御されていること、 Ca^{2+} はトロポニン C との結合を介して、アクトミオシンの活動を制御していることなどが解明され (Ebashi 1963), 筋の活動における SR の重要性が認識されるようになった。

筋が収縮するメカニズムと同様に、筋が疲労するメカニズムは多くの筋生理学者の関心の的であり、精力的な研究が進められてきた。1 世紀以上にわたる研究の結果、筋疲労を誘起する要因としては、高エネルギーリン酸化合物の減少 (Allen et al. 1997), H^+ , Pi あるいは Mg^{2+} などの代謝副産物の蓄積 (Godt and Nosek 1989, Williams et al. 1998), 活動電位の伝達不全 (Fitts 1994), あるいは筋グリコーゲンの枯渇 (Ahlborg et al. 1967, Bergström et al. 1967, Karlsson and Saltin 1971) などが示されてきた。しかしながら、これらの要因だけでは説明できない現象も認められており、筋疲労については現在もなお未解決な部分は少なくはない。

SR の機能の変化が筋疲労に関与している可能性を最初に指摘したのは Eberstein and Sandow (1976) であり、筋収縮における SR の重要性が明らかになった約 10 年後の 1976 年のことであった。これ以降の研究によって、彼らの指摘を支持する研究結果が数多く提示され、SR が筋疲労の成因の 1 つであることが広く認められるようになった (Byrd et al. 1989, Favero et al. 1993). しかしながら、「では、なぜ SR の機能が低下するのか」という問に対しては、幾つかのメカニズムが提唱されてはきたが、現在もなお決定的な確証は得られていない。第一の問題点は、in vitro の実験結果に基づき、

観察された現象が生体内でも起こっているであろうと類推した内容の研究が多いことである。第二は、安静時と筋疲労時の一時期のみを比較し、細胞内で生じたある変化が SR の機能の低下の素因であろうと結論した研究結果が、広く認められてしまったことである。この実験デザインでは、観察された変化と SR の機能の変化との間に因果関係が存在せず、両者がただ単に同期して変化しただけのことである可能性を除去することはできない。ある要因が真に SR の機能低下の原因であるならば、多少の時間差はあるにせよ、両者はほぼ並行して変化するはずであるが、この点を検証した報告はなされていない。SR の縦走管上に点在する Ca^{2+} -ATPase は Ca^{2+} ポンプとして機能し、SR による筋形質から SR 内腔への Ca^{2+} の輸送は、この酵素の働きによってなされる。本研究では、前述の問題点を踏まえ、これまで SR Ca^{2+} -ATPase の機能を左右するとされてきた要因の信憑性を検討することを目的とした。そのためには、まず SR Ca^{2+} -ATPase 活性が漸増あるいは漸減するモデルを確立する必要があるが、実験 1 では、収縮中の SR Ca^{2+} -ATPase 活性の経時的変化に着目し実験を行なった。

成熟した齧歯類の骨格筋には、type I, type IIa, type IIc, type IIb の 4 種類の筋線維が存在する。腓腹筋はこの 4 種類全てを含んでいるが、その中でも type IIb 線維と type IIc 線維の割合が高い。GS はこの 2 種類の線維のみから構成されており、この部位の SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化は、腓腹筋全体の変化をほぼ反映していると考えられる。収縮の時間経過とともに SR Ca^{2+} -ATPase 活性は漸減すると予想されたが、Fig. 6 に示されるように、GS の SR Ca^{2+} -ATPase 活性は収縮開始 1 分後には既に低下しており、以後収縮終了まで顕著に変化しないことが認められた。

2,5-di(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone (TBQ) は、SR Ca^{2+} -ATPase 活性を特異的に抑制する試薬である。Westerbald and Allen (1994)は、TBQ を含む溶液中でマウスの単一筋線維に電気刺激により強縮を繰り返し負荷したところ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇とと

もに強縮張力も漸増することを示した。強縮張力が漸増する原因は、以下のようなと考えられている。1) 正常な状態では、電気刺激に伴い上昇した $[Ca^{2+}]_f$ は、SR Ca^{2+} -ATPase の働きによって、次の強縮の開始時まで安静時の値にまで低下する。2) これに対して、TBQ が存在すると SR Ca^{2+} -ATPase が機能しないため、強縮と強縮の間に $[Ca^{2+}]_f$ は安静時のレベルまで低減することはない。3) そのため、正常な状態と比べ、高い $[Ca^{2+}]_f$ を保持して次の強縮を迎えることになる。4) すると、強縮が重合し張力が漸増する。収縮開始直後から、SR Ca^{2+} -ATPase 活性が低下することの生理的意義についてはよく分からない。収縮開始時直後より、筋中では Pi など筋原線維の機能を抑制する代謝物が蓄積するが (Vandenboon 2004)、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下は、このような条件下においても、発揮張力の低下を最小限に抑えるよう作用しているのかもしれない。SR による Ca^{2+} 取り込み能力が低下し筋形質の $[Ca^{2+}]_f$ が高い状態が継続すると、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼの働きにより筋原線維のタンパクの分解が亢進すること、あるいは DHPR から Ca^{2+} 放出チャネルへのシグナル伝達不全が生じることなどが認められている (Verburg et al. 2006)。したがって、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下は、短期的には筋の収縮機能にプラスに機能するかもしれないが、長期的にはマイナスに作用するものと考えられる。

実験 2 では収縮後の回復過程に着目し検討したところ、5 分間の収縮により低下した SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、収縮終了 30 分後には安静時の値まで回復することが観察された。この結果に基づき実験 3 では、収縮活動後の回復期において、これまで関与が示唆されてきた 1) タンパクの酸化、2) ATP 結合部位の修飾、および 3) SR グリコーゲンの減少と SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化との関連性について検討したところ、1) および 2) は SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の素因ではないことを示す結果を得た。実験 3 では、理由は分からないものの、刺激を加えなかった Cont 側の SR グリコーゲンが、回復過

程において漸減することが観察され、このため、3) との関連性については明確な結論をくだすことはできなかった。そこで実験 4 では、GA による SR グリコーゲンの分解が、SR Ca^{2+} -ATPase の機能および構造に影響を及ぼすか否かを検討し、3) も SR Ca^{2+} -ATPase の機能変化の原因ではないことを示す結果を得た。

このように本研究では、測定したすべてのパラメーターと SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化との間に因果関係は認められなかった。現在の段階では、何が活性低下の成因であるかは不明であるが、この問題を解明するためには、より詳細な項目について検討する必要がある。例えば、本研究で検討したカルボニル含有量の測定は、タンパク酸化の指標として広く用いられてはいるが、全てのアミノ酸の酸化を検出できる手法ではない。例えば、システインおよびメチオニンは、他と比べ酸化に対する感受性が高いアミノ酸であるが、これらが酸化されてもカルボニル基は形成されない。今後、特定のアミノ酸を対象とした研究などに目を向けていくべきであろう。

筋疲労は、回復に短時間で済むものと長時間を要するものとに大別でき、一般的に、前者は、主として代謝性因子の変化が原因しているとされている (Edwards et al. 1977)。一方、低頻度疲労 (LFF) とも呼ばれる後者には、1) 低頻度刺激での発揮張力が選択的に低下する、2) 張力が完全に回復するまでに数時間から数日間を要する、3) 筋中電解質および代謝産物の変化を伴わない、などの特徴がある (Jones 1996)。実験 2 の結果から (Fig. 8)、本実験で用いた収縮モデルにおいても、LFF が誘起されることが示された。LFF は、SR からの Ca^{2+} 放出が低下することによって起こるとされている (Westerblad et al. 1993, Jones 1996, Hill et al. 2001)。本研究では、ホモジネイトを用い、SR Ca^{2+} 放出速度について検討し、収縮により低下することが認められたが、その原因については言及できなかった。これは、SR Ca^{2+} 放出チャネルの構造変化について検討するためには、極めて多量の筋が必要とされるためである。今後、この問題を解

決し SR の Ca^{2+} 放出機能が低減するメカニズムについても明らかにする必要がある。

IX章 総括

本研究は、収縮活動に伴う筋小胞体の機能変化の要因を解明することを目的とし、以下の実験を行った。

実験 1 収縮収縮に伴う筋小胞体の機能の経時的変化

本実験では、Wistar 系雄性ラットを用い、収縮活動に伴う筋小胞体 (SR) の機能の変化を経時的に検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し、坐骨神経に 2 秒に 1 回、75 Hz の電気刺激を 1, 3, 5, 30 分間加えることにより、筋収縮を誘起した。刺激終了後、直ちに腓腹筋表層部 (GS), 腓腹筋深層部 (GD) およびヒラメ筋 (SOL) を摘出し、後の分析に用いた。電気刺激を加える脚を実験 (Stim) 側、反対脚をコントロール (Cont) 側とした。電気刺激中の強縮張力, SR の Ca^{2+} 取り込み速度, Ca^{2+} 放出速度および Ca^{2+} -ATPase 活性を測定し、次の結果を得た。

1. 収縮により発揮張力は漸減し、5 分後には初期値に対し 51% にまで低下した。以後、顕著な変化はみられず、刺激開始 5 分後と 30 分後との間には有意差は認められなかった。
2. GS では、SR Ca^{2+} 取り込み速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、測定した全ての刺激時間において、Stim 側が Cont 側に対して有意な低値を示した。GD では、SR Ca^{2+} 取り込み速度は刺激開始 3 分後および 5 分後、SR Ca^{2+} -ATPase 活性は刺激開始 5 分後において、Stim 側が Cont 側に対し有意な低値を示した。SOL では、収縮活動

に伴う SR Ca^{2+} 取り込み速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化は認められなかった。

3. SR Ca^{2+} 放出速度は, GS では刺激開始 3 分後, 5 分後および 30 分後において, Cont 側と比較して Stim 側が有意な低値を示した。GD では収縮開始 5 分後および 30 分後において Stim 脚が Cont 脚に対し有意な低値を示したが, SOL では収縮活動に伴う変化は認められなかった。

以上の結果より, GS では SR Ca^{2+} 取り込み速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性は, 収縮開始直後より低下し, 以後大きく変化しないこと, また SR Ca^{2+} 放出速度はこれらと比較して遅れて低下することが明らかになった。また, 収縮に伴う SR の機能の変化の様相は筋線維のタイプによって異なり, type II 線維と比べ type I 線維では変化が生じにくいことが認められた。

実験 2 収縮活動後の回復期における筋小胞体の機能の経時的変化

本実験では, Wistar 系雄性ラットを用い, 収縮活動後の回復過程における SR の機能の変化を経時的に検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し, 坐骨神経に 2 秒に 1 回, 75 Hz の電気刺激を 5 分間加え, 刺激終了直後, 刺激終了 5 分後, 10 分後, 30 分後および 60 分後に GS および GD を摘出し後の分析に用いた。電気刺激を加えた脚を Stim 側, 電気刺激を加えない反対脚を Cont 側として用いた。収縮活動前後の張力-頻度曲線, SR Ca^{2+} 取り込み速度, SR Ca^{2+} 放出速度および SR Ca^{2+} -ATPase 活性を測定し, 次の結果を得た。

1. 5分間の電気刺激による収縮活動によって、高頻度（100 Hz）の強縮張力は収縮前と比べ約 60%にまで低下した。この張力は、10分の安静により約 85%にまで回復した。一方、低頻度（40 Hz）の強縮張力は、収縮により約 50%にまで低下し、60分後に回復することが認められた。
2. SR Ca^{2+} 取り込み速度は、GS、GD のいずれも有意な変化を示さなかった。
3. SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、GS では収縮終了 10 分後まで、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。GD では、有意な変化は観察されなかった。
4. SR Ca^{2+} 放出速度は、GS では収縮終了 10 分後まで、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。GD では、有意な変化は観察されなかった。

以上の結果より、電気刺激による 5 分間の収縮活動後、GS では低下した SR Ca^{2+} -ATPase 活性および SR Ca^{2+} 放出速度の回復には、約 30 分の時間を要することが明らかとなった。また、GS と比べ GD では、電気刺激による変化の再現性が低い傾向にあることが認められた。

実験 3 収縮活動後の回復期における筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の要因

本実験では、Wistar 系雄性ラットを用い、収縮活動後の回復過程における、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化の要因について検討した。張力計が取り付けられたフットホルダーにラットの片脚を固定し、坐骨神経に 2 秒に 1 回、75 Hz の電気刺激を 5 分間加え、刺激終了直後、刺激終了 10 分後および 30 分後に GS を摘出し後の分析に用いた。電気刺激を加えた脚を Stim 側、電気刺激を加えない反対脚を Cont 側として用いた。摘出した筋から、SR Ca^{2+} -ATPase 活性、SR Ca^{2+} -ATPase に含有されるカルボニル基の量、SR に付着するグリコーゲン (SR グリコーゲン) とグリコーゲンフォスホリラーゼ

(GP) の量および SR Ca^{2+} -ATPase に結合する fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合量を測定し、次の結果を得た。

1. SR Ca^{2+} -ATPase 活性は、収縮終了直後および 10 分後において、Cont 側と比べ Stim 側で有意な低値が、また、Stim 側間での比較では、収縮終了直後に対し 30 分後の方で有意な高値が認められた。
2. SR Ca^{2+} -ATPase のカルボニル含有量は、収縮終了直後および収縮終了 30 分後において、Cont 側と比べ Stim 側で有意な高値が認められた。
3. FITC 結合量は、収縮直後および刺激終了 30 分後において、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が観察された。
4. SR グリコーゲン量および GP 量は、収縮直後および刺激終了 10 分後において、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値がみられた。

以上の結果より、収縮活動の回復過程において、SR Ca^{2+} -ATPase 活性の変化とタンパクの酸化および ATP 結合部位の構造的変化との間に、関連性がないことが示唆された。

実験 4 グリコーゲンの減少が筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能およびその構造に及ぼす影響

本研究では、SR グリコーゲンが、SR Ca^{2+} -ATPase の構造および SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を検討することを目的とした。ラットの後肢骨格筋の速筋を摘出し、SR を精製する過程で、グリコーゲン分解酵素であるグルコアミラーゼ (GA) で処理し、後の分析に供した。GA の処理を行なう群を実験 (Exp) 群、行なわない群を Cont 群として、

SR グリコーゲン量, ミクロソームに含まれる GP の量, SR Ca^{2+} -ATPase への FITC の結合量および SR Ca^{2+} -ATPase 活性を測定し, 以下の結果を得た.

1. GA 処理によって, Cont 群に対し Exp 群では, SR グリコーゲンは 5.9%, GP 含有量は 29.8%に減少した.
2. GA 処理によって, Cont 群に対し Exp 群では, FITC 結合量は 41.5%の高値が認められた.
3. GA 処理によって, SR Ca^{2+} -ATPase 活性および ATP に対する酵素の親和性には変化は認められなかった.

以上の結果から, SR グリコーゲンおよび GP の減少は, SR Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を及ぼさないことが示唆された.

X章 結 論

本研究の結果から得られた結論は、以下に示す通りである。

1. 電気刺激による収縮活動に伴い速筋の筋小胞体 (SR) カルシウムイオン (Ca^{2+}) 誘因性 ATPase (SR Ca^{2+} -ATPase) 活性は、収縮開始直後より低下しその後も大きく変化しないが、遅筋では収縮活動に伴う変化をほとんど示さないことが明らかとなった。
2. 電気刺激による収縮活動後、速筋の SR Ca^{2+} -ATPase 活性がその機能を回復するには、約 30 分の時間を要することが明らかとなった。
3. 収縮活動に伴う SR Ca^{2+} -ATPase 活性の低下には、タンパクの酸化、ATP 結合部位の修飾、SR に付着するグリコーゲンおよびグルコーゲンフォスホリラーゼの低減のいずれも関与していないことが明らかとなった。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，懇切丁寧なご指導とご教示を頂きました，広島大学大学院総合科学研究科 和田 正信教授に，論文作成に際してご校閲ならびにご助言いただきました安藤 正昭教授，山崎 昌廣教授，長谷川 博准教授に深甚なる謝意を表します。また，物心両面にわたりご協力いただきました広島大学総合科学部運動生理・生化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

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.
- Ahlborg, B. J., Bergström, J., Ekelund L. G. and Hultman, E. (1967) Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.* 70: 129-142.
- Allen, D. G., Lännergren, J. and Westerblad, H. (1997) The role of ATP in the regulation of intracellular Ca^{2+} release in single fibers of mouse skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 498: 587-600.
- Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D. and Raj, D. A. (2000) Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell Biochem.* 179: 135-145.
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. and Muntener, M. (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.* 80: 1215-1265.
- Bergström, J., Hermanson, L., Hultman, E. and Saltin, B. (1967) Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol. Scand.* 71: 140-150.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 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. (1989) Changes in force and intracellular metabolites during fatigue of human skeletal muscle. *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^{2+} release and contractile protein function in intact mouse skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 498: 17-29.
- Cuenda, A., Centeno, F. and Gutierrez-Merino, C. (1991) Modulation by phosphorylation of glycogen phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett.* 283: 273-276.
- Damiani, E. and Margreth, A. (1990) Specific protein-protein interactions of calsequestrin with junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 1253-1259.
- Davey, D. F. and O'Brien, G. M. (1978) The sarcoplasmic reticulum and T-system of rat extensor digitorum longus muscles exposed to hypertonic solutions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56: 409-419.
- Davey, D. F. and Wong, S. Y. (1980) Morphometric analysis of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 58: 213-230.
- Dossett-Mercer, J., Green, H., Chin, E. R. and Grange, F. (1994) Preservation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -sequestering function in homogenates of

- different type composition following sprint activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1231-1237.
- Dossett-Mercer, J., Green, H., Chin, E. R. and Grange, F. (1995) Failure of short term stimulation to reduce sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function in homogenates of rat gastrocnemius. *Mol. Cell Biochem.* 146: 23-33.
- Duke, A. M. and Steele, D. S. (2000) Characteristics of phosphate-induced Ca^{2+} efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 278: C126-C135.
- Dutka, T. L., Cole, L. and Lamb, G. D. (2005) Calcium phosphate precipitation in the sarcoplasmic reticulum reduces action potential-mediated Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 289: C1502-C1512.
- Dux, L. (1993) Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 122: 70-147.
- Dux, L. and Martonosi, A. (1984) Membrane crystals of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum of fast and slow skeletal and cardiac muscles. *Eur. J. Biochem.* 141: 43-49.
- Ebashi, S. (1961) Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* 50: 57-68.
- Eberstain, A. and Sandow, A. (1976) Fatigue mechanisms in muscle fibers. In: Guttman, E. and Hink, P. (eds) *The effect of use and disuse in neuromuscular function.* Elsevier, Amsterdam, pp 515-526.
- Edwards, R. H., Hill, D. K., Jones, D. A. and Merton, P. A. (1977) Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J. Physiol. (Lond.)* 272:

- 769-778.
- Favero, T. G. (1999) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} 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^{2+} -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^{2+} release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch.* 422: 472-475.
- Favero, T. G., Webb, J., Papiez, M., Fisher, E., Trippichio, R. J., Broide, M. and Abramson, J. J. (2003) Hypochlorous acid modifies calcium release channel function from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Appl. Physiol.* 94: 1387-1394.
- Fitts, R. H. (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol. Rev.* 74: 49-94.
- Fitts, R. H. and Holloszy, J. O. (1976) Lactate and contractile force in frog muscle during development of fatigue and recovery. *Am. J. Physiol.* 231: 430-433.
- Friden, J., Seger, J. and Ekblom, B. (1989) Topographical localization of muscle glycogen: an ultrahistochemical study in the human vastus lateralis. *Acta Physiol. Scand.* 135: 381-391.
- Fryer M. W., Owen, V. J., Lamb, G. D. and Stephenson, D. G. (1995) Effects of creatine phosphate and Pi on Ca^{2+} movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 482: 123-140.
- 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.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. A. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
- Heilbrunn, L. V. and Wiercinsky, F. J. (1947) Action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell Comp. Physiol.* 19: 15-32.
- Helander, I., Westerblad, H. and Katz, A. (2002) Effects of glucose on contractile function, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and glycogen in isolated mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 282: C1306-C1312.
- Hill, C. A., Thompson, M. W., Ruell, P. A., Thom, J. M. and White, M. J. (2001) Sarcoplasmic reticulum function and muscle contractile character following fatiguing exercise in humans. *J. Physiol. (Lond.)* 531: 871-878.
- Holloway, G. P., Green, H. J. and Tupling, A. R. (2006) Differential effects of repetitive activity on sarcoplasmic reticulum responses in rat muscles of different oxidative potential. *Am. J. Physiol.* 290: R393-R404.
- Inesi, G. and Hill, T. L. (1983) Calcium and proton dependence of sarcoplasmic

- reticulum. *Biophys. J.* 44: 271-280.
- Jones, D. A. (1996) High- and low-frequency fatigue revisited. *Acta Physiol. Scand.* 156: 265-270.
- Jorgensen, A. O. and Jones, L. R. (1986) Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. An immunocytochemical and biochemical study. *J. Biol. Chem.* 261: 3775-3781.
- Kamada, T. and Kinoshita, H. (1943) Disturbances initiated from the naked surface of muscle protoplasm. *Jap. J. Zool.* 10: 469-493.
- Karlsson, J. and Saltin, B. (1971) Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J. Appl. Physiol.* 31: 203-206.
- Karlsson, J. and Saltin, B. (1970) Lactate, ATP, and CP in working muscles during exhaustive exercise in man. *J. Appl. Physiol.* 29: 598-602.
- Klebl, B. M., Ayoub, A. T. and Pette, D. (1998) Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.* 422: 381-384.
- Lamb, G. D., Junankar, P. R. and Stephenson, D. G. (1995) Raised intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J. Physiol. (Lond.)* 489: 349-362.
- Leberer, E., Hertner, 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.
- Lees, S. J., Franks, P. D., Spangenburg, E. E. and Williams, J. H. (2001) Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects

- of fatiguing activity. *J. Appl. Physiol.* 91: 1638-1644.
- Lees, S. J. and Williams, J. H. (2004) Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum glycogen status influences Ca^{2+} uptake supported by endogenously synthesized ATP. *Am. J. Physiol.* 286: C97-C104.
- LePeuch, C. J. and Demaille, J. G. (1989) Covalent regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* 10: 397-400.
- Li, J. L., Wang, X. N., Fraser, S. F., Carey, M. F., Wrigley, T. V. and McKenna, M. J. (2002) Effects of fatigue and training on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 92: 912-922.
- Lowry, O. H. and Passonneau, J. V. (1972) A flexible system of enzymatic analysis. Academic, New York.
- Luckin, K. A., Favero, T. G. and Klug, G. A. (1991) Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca^{2+} -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 46: 391-405.
- Macdonald, W. A. and Stephenson, D. G. (2006) Effect of ADP on slow-twitch muscle fibres of the rat: implications for muscle fatigue. *J. Physiol. (Lond.)* 573: 187-198.
- Mandel, F., Kranias, E. G., DeGende, A. C., Sumida, M. and Schwartz, A. (1982) The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: a comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 50: 310-317.
- Matsunaga, S., Harmon, S., Gohlsch B., Ohlendieck, K. and Pette, D. (2001) Inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency

- stimulated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22: 685-691.
- Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T. and Wada, M.
(2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflügers Arch.* 446: 394-399.
- Matsunaga, S., Yamada, T., Mishima, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M. and Wada, M.
(2007) Effects of high-intensity training and acute exercise on in vitro function of rat sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Appl. Physiol.* 99: 641-649.
- Metzger, J. M. and Fitts, R. H. (1987) Role of intracellular pH in muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 62: 1392-1397.
- 三島隆章, 山田崇史, 坂本誠, 和田正信 (2006) 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—. *体力科学* 55: 503-512
- 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.
- Okamoto, K., Wang, W., Rounds, J., Chambers, E. A. and Jacobs, D. O. (2001) ATP from glycolysis is required for normal sodium homeostasis in resting fast-twitch rodent skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 281: E479-E488.
- Posterino, G. S. and Fryer, M. W. (1998) Mechanism underlying phosphate-induced failure of 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.
- Ringer S. (1883) A further contribution regarding the influence of the blood on the

- contraction of the heart. *J. Physiol. (Lond.)* 4: 29-42.
- Ruegg, J. C. (1988) Calcium in muscle activation. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-300.
- Simonides, W. S. and van Hardeveld, C. (1990) An assay for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in muscle homogenates. *Anal. Biochem.* 191: 321-331.
- Stienen, G. J., Papp, Z. and Zaremba, R. (1999) Influence of inorganic phosphate and pH on sarcoplasmic reticular ATPase in skinned fibers of *Xenopus Laevis*. *J. Physiol. (Lond.)* 518: 735-744.
- Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler J. S. and Meissner, G. (2001) Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 276: 15625-15630.
- 竹島浩 (1998) リアノジンレセプター. *蛋白質 核酸 酵素* 43: 1603-1609.
- 竹島浩 (2003) リアノジン受容体と結合膜構造. *日薬理誌* 121: 203-210.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 4350-4354.
- Tupling, A. R. (2004) The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: role of the sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Can. J. Appl. Physiol.* 29: 308-329.
- Vandenboon, R. (2004) The myofibrillar complex and fatigue. *Can. J. Appl. Physiol.* 29: 330-356.
- Verburg, E., Dutka, T. L. and Lamb, G. D. (2006) Long-lasting muscle fatigue: partial disruption of excitation-contraction coupling by the elevated cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ during contractions. *Am. J. Physiol.* 290: C1199-C1208.

- Viner, R. I., Krainev, A. G., Williams, T. D., Schoneich, C. and Bigelow, D. J. (1997) Identification of oxidation-sensitive peptides within the cytoplasmic domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Biochemistry* 36: 7706-7716.
- 和田正信, 稲嶋修一郎, 安田俊広, 松永智 (2001) 筋小胞体の構造および筋活動に伴うその機能の変化. *体育学研究*. 46: 443-459.
- 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. and Allen, D. G. (1994) The role of sarcoplasmic reticulum in relaxation of mouse muscle: effects of 2,5-di (tert-butyl) -1,4-benzohydroquinone. *J. Physiol. (Lond.)* 474: 291-301.
- Westerblad, H., Allen, D. G., Bruton, J. D. Andrade, F. H. and Lännergren, J. (1998) Mechanisms underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol. Scand.* 162: 253-260.
- Westerblad, H., Allen, D. G. and Lännergren, J. (2002) Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol. Sci.* 17: 17-21.
- Westerblad, H., Duty, S. and Allen, D. G. (1993) Intracellular calcium concentration during low-frequency fatigue in isolated single fibers of mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 75: 382-388.
- Williams J. H., Ward, C. W., Spangenburg, E. E., Nelson, R., Stavrianeas, S. and Klug, G. A. (1998) Glucose 6-phosphate alters rat skeletal muscle contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum function. *Exp. Physiol.* 83: 489-502.
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. and Stamler, J. S. (1998) Activation of the cardiac

calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279: 234-237.

Yamada, S. and Tonomura, Y. (1972) Reaction mechanism of the Ca^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. VII. Recognition and release of Ca^{2+} ions. *J. Biochem.* 72: 417-425.

山本啓一, 丸山工作 (1986) 筋肉. 化学同人, pp 101-118.