



---

疲労困憊に至る筋収縮後における  
筋疲労回復遅延の要因

---

17300209

平成17年度～平成19年度科学研究費補助金  
[基盤研究(B)] 研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 和田正信

島大学大学院総合科学研究科教授



## はしがき

興奮収縮連関とは、神経からのインパルスが筋線維に到達してから、筋線維の収縮が完了するまでの一連の過程を指す。興奮収縮連関の1サイクルは、1) 形質膜での活動電位の伝導、2) 横行小管から筋小胞体へのシグナル伝達、3) 筋小胞体から筋形質への $\text{Ca}^{2+}$ 放出、4) 筋原線維におけるクロスブリッジの形成、5) ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントの滑り込み運動、6) 筋小胞体による $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み開始、7) アクチンフィラメントとミオシン頭部の解離であり、実に多くの器官が関与する複雑な過程である。筋生理学の領域では、筋収縮を繰り返して行うことによって起こる筋力あるいはパワーの低下を「筋疲労」と呼ぶ。筋疲労のメカニズムに関する研究とは、「筋細胞内の環境がどのように変わると、興奮収縮連関のどの過程がどの程度変化するのか」を解明する活動であるといえよう。その歴史は1世紀以上にわたるが、現在もなお明確ではない部分が少なくはない。

「疲労した筋をカフェインで処置すると低下した張力が回復する」ことを示したEberstein and Sandowの報告(1976年)は、筋疲労についての研究分野の転機となった。カフェインは細胞質内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させる作用を持ち、したがって、

彼ら示す結果は細胞内における $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の調節不全が筋疲労の主要因であることを示唆する。骨格筋では、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は筋小胞体によって制御されており、以来、筋が疲労する成因而として筋小胞体が注目を浴びることとなった。多くの研究がなされ、現在では、筋疲労に筋小胞体の機能の変化が大きく関与していることは広く認められている。

競技の現場では、1) 疲労困憊に至るまで筋に負荷をかけることを余儀なくされた場合と、2) その一歩手前で競技を終了できた場合とを比べると、前者の方が競技終了後における筋疲労回復速度はるかに低下することが知られている。1)と2)とを比較すると、運動の主働筋にかかる負荷の大きさに顕著な差異があるとは考えられず、従来筋疲労の原因とされてきた、代謝産物の蓄積、活動電位の伝達不全あるいはグリコーゲンの枯渇などから、疲労回復速度低下の素因を説明することはできない。前述のように、筋小胞体の機能の変化が筋疲労の主要因の1つであるならば、筋疲労の回復過程にも筋小胞体が深く関与していることは、十分に考えられる。そこで本研究では、筋疲労の回復速度が左右される原因を、筋小胞体に焦点をあて検討することを目的とした。皆様の御批判をお願いしたい。



## 研究組織

- 研究代表者 : 和田 正信 (広島大学大学院総合科学研究科教授)  
研究分担者 : 松永 智 (大阪市立大学都市健康スポーツ研究センター講師)  
研究分担者 : 三島 隆章 (八戸短期大学幼児保育学科講師)  
(研究協力者 : 山田 崇史)  
(研究協力者 : 杉山 美奈子)  
(研究協力者 : 坂本 誠)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	3,300,000	0	3,300,000
平成18年度	1,300,000	0	1,300,000
平成19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	6,200,000	480,000	6,680,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文.

- 1) 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. *Pflügers Arch.* 452: 117-123.
- 2) 和田正信, 坂本 誠, 杉山美奈子, 松永 智 (2006) 高強度運動における筋疲労の要因: 無機リン酸, グリコーゲンおよび活性酸素の影響. *体育学研究* 51: 399-408.
- 3) Mishima, T., Yamada, T., Sakamoto, M., Sugiyama, M., Matsunaga, S. and Wada, M. (2008) Time course of changes in in vitro sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -handling and  $Na^{+}$ - $K^{+}$ -ATPase activity during repetitive contractions. *Pflügers Arch.* (online publication).

### (2) 学会発表

- 1) 三島隆章, 山田崇史, 坂本 誠, 杉山美奈子, 和田正信: 電気刺激による $Ca^{2+}$ ポンプおよび $Na^{+}$ - $K^{+}$ ポンプの機能の変化. 第60回日本体力医学会. 2005年9月. 倉敷市.
- 2) 杉山美奈子, 山田崇史, 三島隆章, 坂本 誠, 和田正信: 筋小胞体に付着するグリコーゲンおよびグリコーゲンフォスホリラーゼがSR  $Ca^{2+}$ -ATPaseの機能に及ぼす影響. 第60回日本体力医学会. 2005年9月. 倉敷市.
- 3) 三島隆章, 山田崇史, 坂本 誠, 杉山美奈子, 松永 智, 和田正信: 筋疲労に伴う骨格筋の機能の経時的変化. 第61回日本体力医学会. 2006年9月. 神戸市.
- 4) 三島隆章, 松永 智, 和田正信: 収縮後の回復期における筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPaseの機能変化の要因 - ATP結合部位の構造的変化に着目して -. 第62回日本体力医学会. 2007年9月. 秋田市.

# 研究成果

## 目 次

I. 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 1)	5
1. 緒言	5
2. 実験方法	5
A. 被検動物および実験プロトコール	5
B. 被検筋および筋タンパクの抽出	5
C. 分析項目	5
D. 統計処理	6
3. 実験結果	6
A. 張力	6
B. 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度	7
C. SR Ca <sup>2+</sup> 取り込み速度	7
D. SR Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性	8
E. SR Ca <sup>2+</sup> 放出速度	8
4. 考察	9
5. 要約	10
II. 収縮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)	12
1. 緒言	12
2. 実験方法	12
A. 被検動物および実験プロトコール	12
B. 分析項目	12
C. 統計処理	12
3. 実験結果	12
A. 張力-頻度特性	12
B. SR Ca <sup>2+</sup> 取り込み速度	13
C. SR Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性	13
D. SR Ca <sup>2+</sup> 放出速度	14
4. 考察	14
5. 要約	15
III. 収縮活動後の回復期における筋小胞体 Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性の変化の要因 (実験3)	18
1. 緒言	18
2. 実験方法	18
A. 被検動物および実験プロトコール	18
B. 被検筋, 筋タンパクの抽出およびSRの精製	18

C. 分析項目 -----	19
D. 統計処理 -----	20
3. 実験結果 -----	20
A. SR Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性 -----	20
B. カルボニル量およびFITC量 -----	20
C. グリコーゲン量およびグリコーゲンフォスホリラーゼ量 -----	20
4. 考察 -----	21
5. 要約 -----	22
IV. グリコーゲンの減少が筋小胞体Ca <sup>2+</sup> -ATPaseの機能およびその構造に及ぼす影響 (実験4) ----	24
1. 緒言 -----	24
2. 実験方法 -----	24
A. 被検動物 -----	24
B. 被検筋およびSRの精製 -----	24
C. 分析項目 -----	24
D. 統計処理 -----	25
3. 実験結果 -----	25
A. SRグリコーゲン量 -----	25
B. SR Ca <sup>2+</sup> -ATPaseおよびグリコーゲンフォスホリラーゼ量 -----	25
C. FITC結合量 -----	25
D. SR Ca <sup>2+</sup> -ATPase活性およびATPに対する親和性 -----	26
4. 考察 -----	26
5. 要約 -----	27
V. 既刊論文	
1. Effects of reduced glycogen on structure and in vitro function of rat sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase. Pflügers Arch. 452: 117-123.	
2. 高強度運動における筋疲労の要因: 無機リン酸, グリコーゲンおよび活性酸素の影響. 体育学研究 51: 399-408.	
3. Time course of changes in in vitro sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -handling and Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase activity during repetitive contractions. Pflügers Arch. (online publication).	

# I. 収縮活動に伴う筋小胞体の機能の経時的変化 (実験 1)

和田正信・三島隆章・松永 智・山田崇史・坂本 誠・杉山美奈子

## 1. 緒 言

袋状膜構造をなす筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) は, 1)  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵, 2)  $\text{Ca}^{2+}$  の放出, 3)  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みの 3 つの機能を有し, これらの作用により筋細胞内の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) は精巧に調節されている. 筋が疲労する原因の 1 つに, SR の機能が低下することが示されているが (Wada et al., 2001; Tupling, 2004), そのメカニズムは必ずしも明確にはなっていない. 本研究の目的は, 筋疲労が回復する速度が変化する要因を SR に着目して検討することであるが, そのためには実験動物の筋に一定の負荷を加えることが不可欠である. トレッドミルなどを用いた自発運動では, 被験動物の体重の差異あるいは運動遂行状態の違いなどに起因して, 対象とする筋に厳密に同等の負荷を加えることは極めて困難である. そこで本研究に先立って, 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, このモデルによる収縮中, SR の機能がどのように変化するかを把握する必要があると考えた. そこで本実験では, 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を目的とした.

## 2. 実験方法

### A. 被験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. これらを 12 時間の明暗サイクルの照明下で温度を 20~24°C に常時維持した飼育室において飼育した. なお, 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. 8 週齢時から飼育を始め, 一週間の予備飼育の後, 実験を行った. 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) に繋がれた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, 刺激を加えない反対脚をコントロール (Cont) 側とした.

### B. 被検筋および筋タンパクの抽出

被検筋には, 速筋線維のみから構成されている腓腹筋表層部 (superficial portion of gastrocnemius; GS), 速筋線維と遅筋線維が混在している腓腹筋深層部 (deep portion of gastrocnemius; GD) および主に遅筋線維から構成されているヒラメ筋 (soleus; SOL) を用いた. 収縮活動終了直後直ちに被検筋を摘出し, 一部 (約 20 mg) を代謝産物測定用サンプルとして液体窒素で瞬間凍結した. 残りの筋を冷却した抽出液 (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. 得られたホモジネイトを 20 分間遠心分離し (5,000×g), 上清を SR の機能の測定に用いた.

### 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

Lowry and Passonneau (1972) の方法に従い, 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度を測定した. 凍結乾燥した筋に冷却した 2 M 過塩素酸を加え, -10°C で数分間放置した. 0°C で 10 分間遠心分離した後 (10,000×g), 得られた上清を筋中乳酸濃度の分析に, ペレットを筋グリコーゲン濃度の分

析に用いた。用いた反応溶液は、乳酸濃度測定では 100 mM ヒドラジン, 0.5 mM NAD, 100 mM 2-amino-2-methyl-propanol (pH 10.0), グリコーゲン濃度の測定では 1 M トリス/塩酸, 100 mM 塩化マグネシウム, 500 mM ジチオトレイトール, 300 mM ATP, 50 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 8.1) であった。反応終了後, 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 Ca<sup>2+</sup>取り込みおよび放出速度の測定

SR の Ca<sup>2+</sup>取り込み・放出速度は, Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬である indo-1 を用い, 37°C の条件下で Ward et al. (1998) の方法に従って測定した。実験に使用した反応溶液の組成は, 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (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。反応溶液にサンプルを加え, 37°C で 2 分間インキュベートした後, Mg-ATP (最終濃度 4 mM) を加えることによって反応を開始した。反応溶液中の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>f</sub> 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。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>f</sub> は, Grynkiewicz et al. (1985) の報告に従い

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

の式に基づいて計算した。ここで, R はサンプルの蛍光比 (405 nm / 500 nm), R<sub>min</sub> は全ての indo-1 が Ca<sup>2+</sup> と結合していない場合の蛍光比, R<sub>max</sub> は全ての indo-1 が Ca<sup>2+</sup> と結合している場合の蛍光比, F<sub>f</sub> は全ての indo-1 が Ca<sup>2+</sup> と結合していない場合の 500 nm 蛍光量, F<sub>b</sub> は全ての indo-1 が Ca<sup>2+</sup> と結合している場合の 500 nm 蛍光量である。また, K<sub>d</sub> は解離定数であり, 250 nM を採用した (Grynkiewicz et al., 1985)。Ca<sup>2+</sup> 放出速度の測定では,

SR Ca<sup>2+</sup>取り込み速度の測定後, 反応溶液中の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>f</sub> 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 Ca<sup>2+</sup> 放出を誘起した。

#### c-3. SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の測定

SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性値は, Simonides and van Hardeveld (1990) の方法に従って測定した。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, 0.4 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 (2 mM) の Ca<sup>2+</sup> は, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase のみを特異的に抑制する。したがって, 初期の NADH の減少速度と高濃度 Ca<sup>2+</sup> を加えた後の減少速度の差が, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性を示すことになる。

#### D. 統計処理

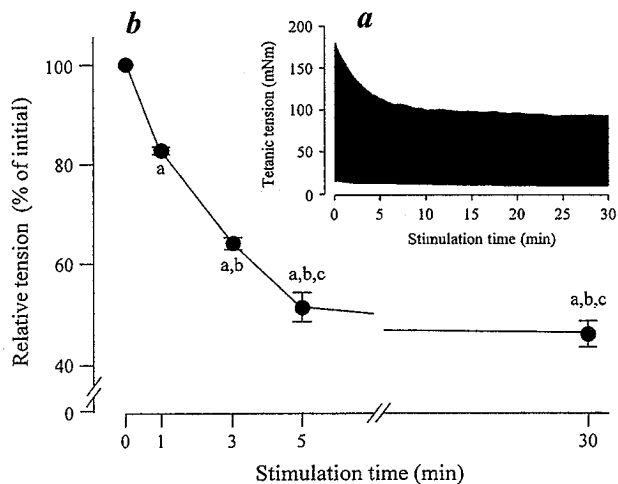
統計量は, 平均 ± 標準誤差で示した。同一個体内の Cont 側と Stim 側との差異の検定には, 対応のある Student's t-test を用いた。また, 刺激時間による変化の差異を検討するため, 二元配置の分散分析を用い, 有意な F 値が検出されたものについては, Scheffe の方法により平均値の差異の有意性を検討した。なお, 有意水準は 5% 未満とした。

### 3. 実験結果

#### A. 張力

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. 1).



**Fig. 1.** A typical example of force output (a) and time-course changes in tetanic tension (b) in 30-min stimulated gastrocnemius muscles. The intact gastrocnemius muscle from the one leg of each rat was fatigued by intermittent tetani evoked by electrical stimulation (100-msec trains at 75 Hz every 2 sec) via the sciatic nerve. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ), as expressed as percentages of the initial values. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 0 min (initial). <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 1 min. <sup>c</sup> $P < 0.05$ , vs 3 min.

#### B. 筋中乳酸濃度および筋グリコーゲン濃度

Table 1 に筋グリコーゲン濃度, Table 2 に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. 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%の高値が観察された. 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, いずれの時間帯においても, Cont 側に対し Stim 側で約75%の低値が観察された. 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示されなかった.

**Table 1. Muscle glycogen concentration.**

	Time	Control	Stimulated
GS	1 min	119.3 $\pm$ 3.0	48.2 $\pm$ 5.1 *
	3 min	118.5 $\pm$ 4.3	31.8 $\pm$ 3.7 *
	5 min	118.2 $\pm$ 5.3	32.4 $\pm$ 3.3 *
	30 min	119.1 $\pm$ 3.2	20.4 $\pm$ 5.9 *
GD	1 min	113.0 $\pm$ 6.8	87.3 $\pm$ 9.0 *
	3 min	117.5 $\pm$ 4.2	86.8 $\pm$ 7.4 *
	5 min	112.8 $\pm$ 5.9	83.1 $\pm$ 7.2 *
	30 min	113.1 $\pm$ 3.3	82.4 $\pm$ 5.1 *
SOL	1 min	73.9 $\pm$ 7.5	68.5 $\pm$ 9.9
	3 min	94.5 $\pm$ 7.6	84.2 $\pm$ 6.0
	5 min	78.3 $\pm$ 9.5	70.6 $\pm$ 9.4
	30 min	82.2 $\pm$ 8.7	65.1 $\pm$ 7.5

For treatment of animals, see legend of Fig. 1. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius; SOL, soleus. \* $P < 0.05$ , vs control.

**Table 2. Muscle lactate concentration.**

	Time	Control	Stimulated
GS	1 min	4.6 $\pm$ 0.2	13.5 $\pm$ 1.3 *
	3 min	4.9 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 1.0 *
	5 min	3.9 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 0.9 *
	30 min	3.9 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.5 †
GD	1 min	4.2 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 1.4 *
	3 min	4.3 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.2
	5 min	3.9 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 1.0
	30 min	3.9 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.2
SOL	1 min	4.4 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.8
	3 min	3.7 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.2
	5 min	3.6 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.6
	30 min	3.4 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.2

For treatment of animals, see legend of Fig. 1. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius; SOL, soleus. \* $P < 0.05$ , vs control. † $P < 0.05$ , vs 1, 3 and 5 min.

#### C. SR Ca<sup>2+</sup>取り込み速度

Fig. 2 に, SR Ca<sup>2+</sup>取り込み速度の変化を示した. GS では, いずれ時間帯においても Cont 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. GD では, 刺激開始3分後および5分後において Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が認められた. 一方, SOL では収縮活動に伴う有意な変化は認められなかった.



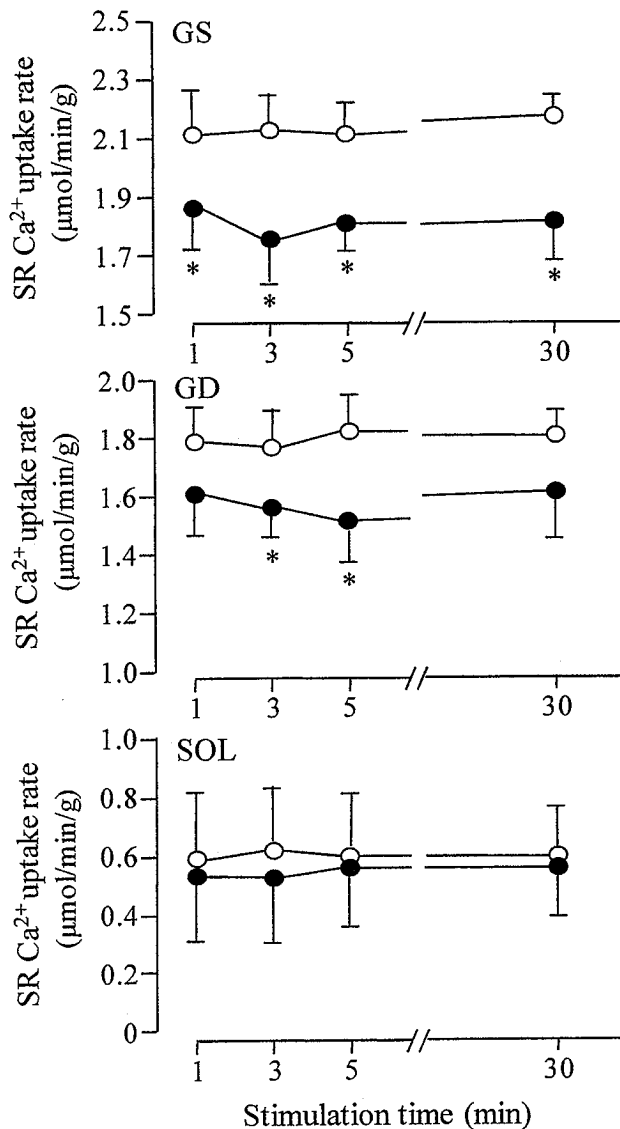


Fig. 2. Time course of changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake rate in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles. For treatment of animals, see legend of Fig. 1. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius; SOL, soleus.  $*P < 0.05$ , vs control.

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

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、SR  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み速度と類似した変化を示した (Fig. 3). GS では、いずれの時間帯においても 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 分後に有意な低値がみられ、Cont 側に対する Stim 側の値は 88%であった。一方 SOL

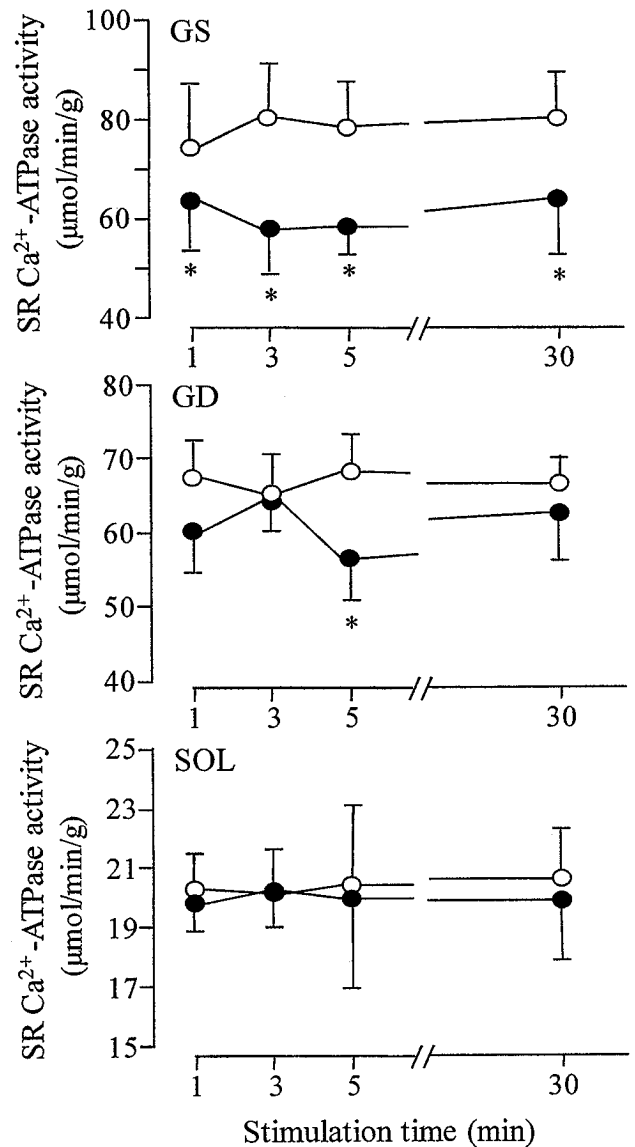


Fig. 3. Time course of changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles. For treatment of animals, see legend of Fig. 1. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius; SOL, soleus.  $*P < 0.05$ , vs control.

では、収縮活動に伴う変化は観察されなかった。

#### E. SR $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度

Fig. 4 に、SR  $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度の変化を示した。GS では収縮開始 3 分後、5 分後および 30 分後に、GD では収縮開始 5 分後および 30 分後に、Cont 側に対し Stim 側で有意な低値が観察された。これに対して、SOL では収縮活動に伴う変化は認められなかった。

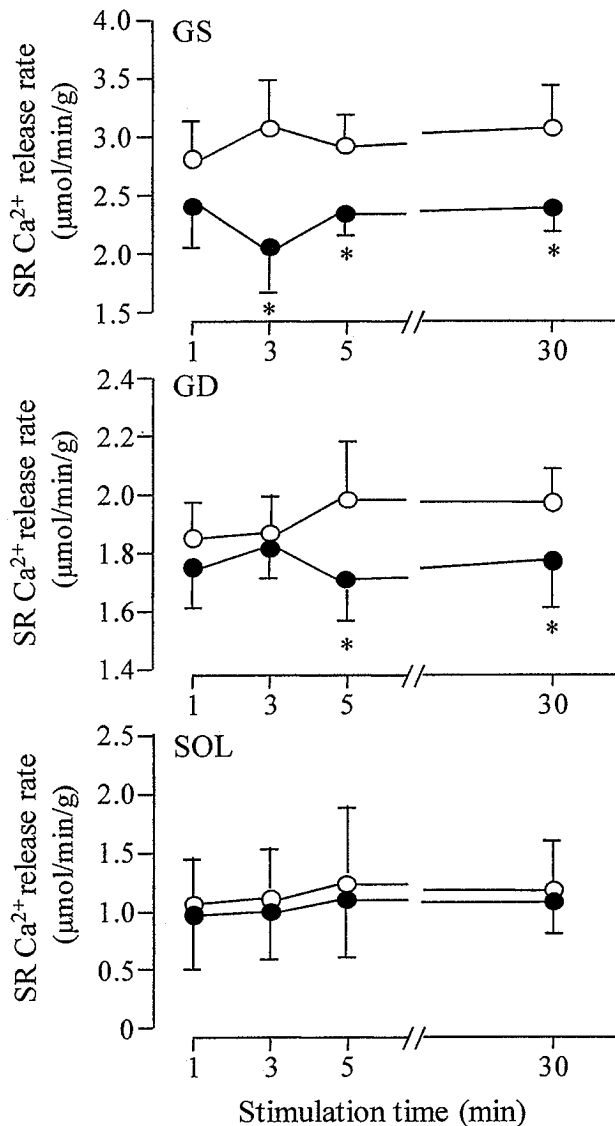


Fig. 4. Time course of changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -release rate in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles. For treatment of animals, see legend of Fig. 1. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius; SOL, soleus. \* $P < 0.05$ , vs control.

#### 4. 考 察

Fig. 1 に示されるように、収縮開始後のいずれの時間帯においても、個体間における張力の偏差は小さく、用いた刺激様式は筋に対して一定の負荷を与えることができるモデルであるといえよう。また、GS では筋中乳酸濃度が数倍にまで増加したことからは (Table 2), 刺激によって少なくとも GS では、強度の高い収縮を行った場合と類似した細胞内環境が誘起されたものと思われる。

本研究で得られた最も重要な知見のひとつは、GS では収縮活動中、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  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、以後その状態が維持されたことである。 $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能力は、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase による  $\text{Ca}^{2+}$  回収能力と  $\text{Ca}^{2+}$  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とされている (Wada et al., 2001). Fig. 2 および Fig. 3 に示されるように、SR  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み速度と SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性とで類似した変化が認められたことは、本実験で用いた条件下では、SR  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み速度は、主として SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性によって規定されていることを示唆する。

GS の  $\text{Ca}^{2+}$  放出速度は、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込みおよび  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性と比べ、遅れて低下することが観察された (Figs. 2, 3 and 4). SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase も  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルも、酸化修飾によって機能が変化するが、その様相は両タンパク間で異なることが報告されている (Favero et al., 1998; Favero, 1999). SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase には、20 個の遊離スルフヒドリル (SH) 基が存在し、これらの状態が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送能力に大きく影響することが示されている。例えば、Favero et al. (1998) は、SR を活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) に曝露すると、遊離 SH 基の数の減少とともに SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が低下すること、またその低下率は、ROS の濃度が高まれば高まるほど大きくなることを報告している。 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルにも、その機能を左右する遊離 SH 基が 50 個存在する。これらを ROS と反応させると、酸化される SH 基が 10 個から 15 個までであれば、 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルの開口確率は高まるが、さらに多くの SH 基が酸化されると、開口確率は逆に低下することが認められている (Sun et al., 2001). 強度の高い筋収縮中では、キサントンオキシダーゼ系によって、ROS の 1 つであるスーパーオキシドが産生され、細胞内の種々の器官の機能に影響を与えることが明らかになっている。SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase と  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルの ROS

に対する感受性の違いが、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み速度と放出速度とで収縮中の経時的変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 (Gollnick et al., 1973a; Gollnick et al., 1973b)。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動員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

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、坐骨神経に電気刺激を 1, 3, 5 および 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 SR の機能を測定し、以下の結果を得た。

1. 発揮張力は 5 分後には初期値の 51% にまで低下し、以後、顕著な変化はみられなかった。
2. SR  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み速度は、GS では全ての時間帯において、GD では収縮開始 3 分後および 5 分後において有意な低値が観察された。一方、

SOL では収縮に起因した変化は認められなかった。

3. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、GS では測定した全ての時間帯において、GD では収縮開始 5 分後において有意な低値が観察された。一方、SOL では収縮に起因した変化は認められなかった。
4. SR  $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度は、GS では収縮開始 3 分後、5 分後および 30 分後において、GD では収縮開始 5 分後および 30 分後において有意な低値が観察された。これに対して、SOL では収縮に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、GS では SR  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み速度および SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、収縮開始直後に低下し、以後大きく変化しないこと、また SR  $\text{Ca}^{2+}$ 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。

## References

- Favero TG (1999). Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release and muscle fatigue. *J Appl Physiol* **87**, 471-483.
- Favero TG, Colter D, Hooper PF and Abramson JJ (1998). Hypochlorous acid inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* **84**, 425-430.
- Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert IV CW, Sembrowich WL, Shepherd RE and Saltin B (1973a). Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibers during prolonged work. *Pflügers Arch* **344**, 1-12.
- Gollnick PD, Armstrong RB, Sembrowich WL, Shepherd RE and Saltin B (1973b). Glycogen depletion pattern in human skeletal muscle fibers after heavy exercise. *J Appl Physiol* **34**, 615-618.
- Grynkiwicz G, Poenie M and Tsien RY (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.

- Lowry OH and Passonneau JV (1972). A flexible system of enzymatic analysis. Academic, New York.
- Simonides WS and van Hardeveld C (1990). An assay for sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in muscle homogenate. *Anal Biochem* **191**, 321-331.
- Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS and Meissner G (2001). Class of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* **276**, 15625-15630.
- Tupling AR (2004). The sarcoplasmic reticulum in muscle fatigue and disease: role of the sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Can J Appl Physiol* **29**, 308-329.
- Wada M, Inashima S, Yasuda T and Matsunaga S (2001). Structure of sarcoplasmic reticulum and activity-induced alteration in its function. *Japan J Phys Educ Hlth Sport Sci* **46**, 443-459.
- Ward CW, Spangenburg EE, Diss LM and Williams JH (1998). Effects of varied fatigue protocols on sarcoplasmic reticulum uptake and release rates. *Am J Physiol* **275**, R99-R104.

## II. 収縮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)

和田正信・三島隆章・松永 智・山田崇史・坂本 誠・杉山美奈子

### 1. 緒言

本研究の目的の 1 つは、SR 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 の機能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 の機能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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性および SR  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み・放出機能の変化について検討した。その結果、GS および GD では収縮によりこれらのパラメータは低下するが、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 の機能は、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 (Mishima et al., 2006)、回復期を利用すれば、本研究の目的を達成できる可能性がある。しかしながら、実験 1 で用いた電気刺激によって、回復期に SR の機能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 分間までについて、SR の機能の変化を経時的に検討することを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 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 20~24°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、実験を行った。

電気刺激による収縮の方法は、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、1 Hz, 40 Hz, 60 Hz, 80 Hz および 100 Hz での収縮を誘起し、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 の機能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。なお、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  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み・放出速度および SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定した。

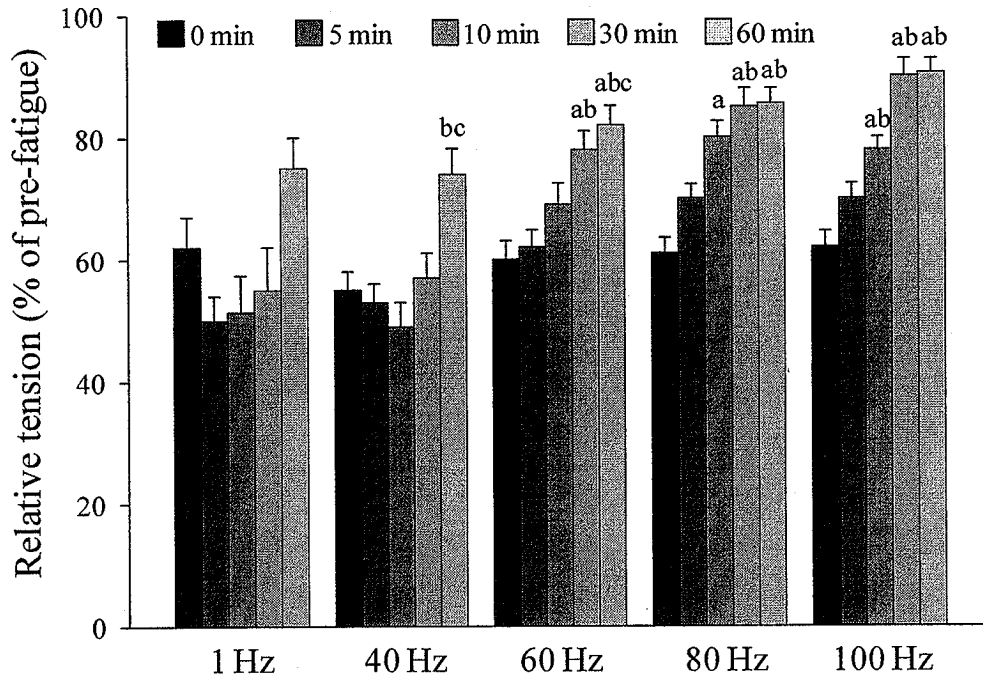
#### C. 統計処理

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. 実験結果

#### A. 張力-頻度特性

Fig. 5 に、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% の値が観察された。40 Hz では収縮終了 60 分後において、



**Fig. 5. Twitch (1 Hz) and tetanic tension of gastrocnemius muscle at different frequencies immediately (0 min), 5 min, 10 min, 30 min and 60 min after 5-min contraction.** The intact gastrocnemius muscle from the one leg of each rat was fatigued by 5-min intermittent tetani evoked by electrical stimulation (100-msec trains at 75 Hz every 2 sec) via sciatic nerve. Values are means  $\pm$  SE ( $n=8$ ), expressed as percentages of the pre-fatigue values. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 0 min. <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 5 min. <sup>c</sup> $P < 0.05$ , vs 10 min.

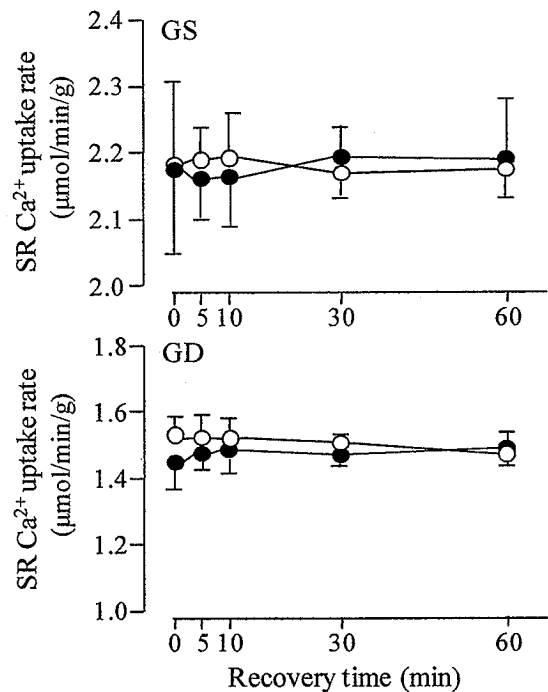
収縮終了5分後および10分後に対し、また60 Hzでは収縮終了30分後以降において、収縮終了直後および5分後に対し有意な高値が認められた。80 Hzと100 Hzでは類似した傾向がみられ、収縮終了10分後以降において、収縮直後と比較して有意な高値が示された。

#### B. SR Ca<sup>2+</sup>取り込み速度

SR Ca<sup>2+</sup>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. 6).

#### C. SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

Fig. 7に、SR Ca<sup>2+</sup>-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つ



**Fig. 6. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-uptake rate in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction.** For treatment of animals, see legend of Fig. 5. Values are means  $\pm$  SE ( $n=8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius.

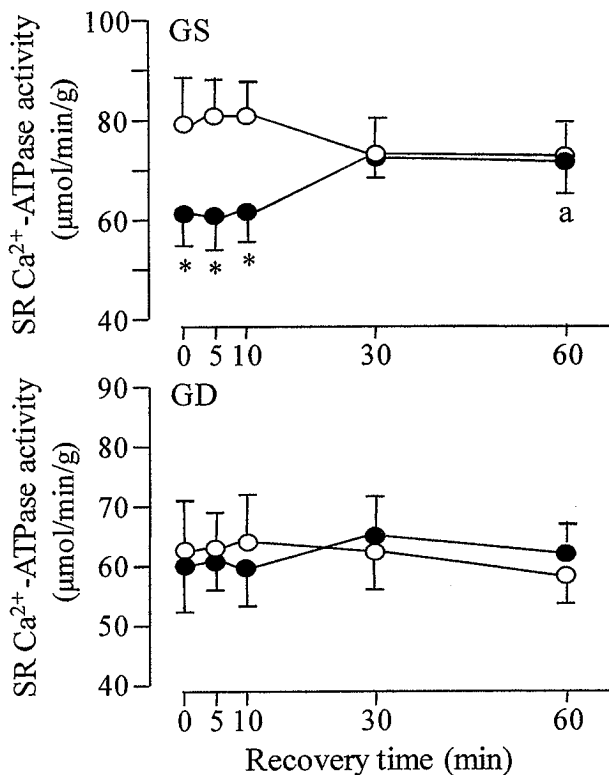


Fig. 7. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction. For treatment of animals, see legend of Fig. 5. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius. \* $P < 0.05$ , vs control. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 5 min.

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 $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度

Fig. 8 に、SR  $\text{Ca}^{2+}$ 放出速度の変化を示した。GS では、収縮直後では、Stim 側で有意な低値が観察され、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 分後まで続いたが、30 分後および 60 分後では 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

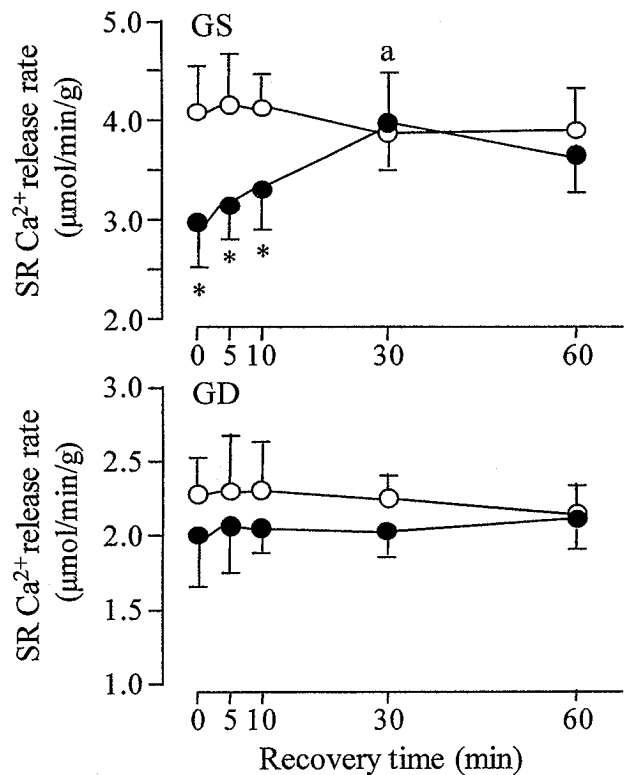


Fig. 8. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -release rate in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction. For treatment of animals, see legend of Fig. 5. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). GS, superficial portion of gastrocnemius; GD, deep portion of gastrocnemius. \* $P < 0.05$ , vs control. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 0 min.

化は観察されなかった。

#### 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における SR の機能について検討し、収縮によって低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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結論している。本研究では、収縮活動直後に低下した GS の SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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. 7), 本研究で用いた収縮では, GS の SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性も, 30~60 分程度で回復することが報告されており (Mishima et al., 2006), 本研究で用いた実験モデルによって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 $[\text{Ca}^{2+}]_f$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ が流入すること, ならびに SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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. 横行小管に存在するジヒドロピリジン受容はボルテージセンサーであり, 活動電位を感知し SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャン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 $[\text{Ca}^{2+}]_f$ が高い状態が継続すると, 1) この部位でのシグナル伝達機能が低下すること (Verburg et al., 2006), あるいは 2)  $\text{Ca}^{2+}$ 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こと (Lamb et al., 1995) などが報告されている. したがって, 収縮によって低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を迅速に回復することは, 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.

有機物が酸化されると, 炭素と酸素が共有二重結合を形成し, カルボニル基 ( $>\text{C}=\text{O}$ ) が生成される. 酸化が進むほど, 含まれるカルボニル基の量が増加することから, その含有量は有機物がどの程度酸化的修飾を受けたかの指標として広く用いられている (Levine, 2002). カルボニル基を指標とした研究によって, 疲労困憊に至る運動によって活性が低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は, 酸化的修飾を受けていることが示されている (Matsunaga et al., 2008). SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の ATP 結合部位には, 酸化に対し感受性の高いペプチドが存在し (Viner et

al., 1997), この部位に構造的な変化が生じるものと考えられている (Luckin et al., 1991). ROS によって低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が還元型グルタチオンにより回復することが, Favero et al. (1998) による *in vitro* の実験から明らかになっている. したがって, 本実験で観察された SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の回復に, 抗酸化物質の作用が関与している可能性が考えられる.

筋グリコーゲン量の変化も, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の回復に関与している可能性も指摘されている. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の構造的な変化によって, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性と  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は低下したが, SR  $\text{Ca}^{2+}$ 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



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 SR の機能を測定し、以下の結果を得た。

1. SR  $\text{Ca}^{2+}$  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。
2. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、GS では収縮終了 10 分後まで、有意な低値がみられた。一方、GD では収縮に起因した変化は観察されなかった。
3. SR  $\text{Ca}^{2+}$  放出速度は、GS では収縮終了 10 分後まで、有意な低値がみられた。一方、GD では収縮に起因した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 において低下した SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性および SR  $\text{Ca}^{2+}$  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。

## References

- Carroll 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.
- Favero TG, Colter D, Hooper PF and Abramson JJ (1998). Hypochlorous acid inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* **84**, 425-430.
- Friden J, Seger J and Ekblom B (1989). Topographical localization of muscle glycogen: an ultra-histochemical study in human vastus lateralis. *Acta Physiol Scand* **135**, 381-391.
- 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.
- Lamb GD, Junankar PR and Stephenson DG (1995). Raised intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J Physiol (Lond)* **489**, 349-362.
- Lees SJ, Franks PD, Spangenburg EE and Williams JH (2001). Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* **91**, 1638-1644.
- Levine RL (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* **32**, 790-796.
- Luckin KA, Favero TG and Klug GA (1991). Prolonged exercise induces structural changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rat muscle. *Biochem Med Metabol Biol* **46**, 391-405.
- Matsunaga S, Harmon S, Gohlsch B, Ohlendieck K and Pette D (2001). Inactivation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in low-frequency stimulated rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 685-691.
- Matsunaga S, Mishima T, Yamada T, Inashima S and Wada M (2008). Alterations in in vitro function and protein oxidation of rat sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase during recovery from high-intensity exercise. *Exp Physiol* **93**, 426-433.
- Mishima T, Yamada T, Sakamoto M and Wada M (2006). Changes in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -sequestering capacity during recovery following high-intensity exercise: comparisons between fast- and slow-twitch muscles. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* **55**, 503-512.
- Verburg E, Dutka TL and Lamb GD (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 RI, Krainev AG, Williams TD, Schoneich C and Bigelow DJ (1997). Identification of oxidation-sensitive peptides within the cytoplasmic domain of

the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. *Biochemistry* **36**, 7706-7711

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

和田正信・三島隆章・松永 智・山田崇史・坂本 誠・杉山美奈子

#### 1. 緒言

収縮活動に伴い SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が低下する成因としては、1) ROS によるタンパクの酸化的修飾 (Matsunaga et al., 2003; Matsunaga et al., 2008), 2) ATP 結合部位の構造的変化 (Luckin et al., 1991) および 3) SR の膜に付着しているグリコーゲン量の低下 (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  $\text{Ca}^{2+}$ -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。本実験の目的は、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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の変化と活性に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. 実験方法

##### 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  $20^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$  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、実験を行った。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。なお、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 phenylmethanesulfonyl fluoride (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  $5,000\times g$  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、 $5^{\circ}\text{C}$  で 1 時間攪拌した。その試料を 60 分間、 $225,000\times g$  で遠心分離しペレットを採取した。これに筋湿重量の 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、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし

た。得られたミ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 のミクロソームは、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 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase およびグリコーゲンフォスホリラーゼ (glycogen phosphorylase; 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法 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) を用いた。セパレイティングゲルの組成は、10% (mass/vol.) ポリアクリルアミド、0.1% (mass/vol.) ビスアクリルアミド、200 mM トリス、100 mM グリシン、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 (pH 8.6) であった。タンパク 20  $\mu\text{g}$  を含むミクロソームを SDS-PAGE に負荷し、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。ゲルの写真をコンピューターに取り込み、NIH-image を用い、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase および GP の量を測定した。なお、GP の量は、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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ミクロソーム (タンパク 13  $\mu\text{g}$  を含有) を、上述の SDS-PAGE により分離した後 (Klebl et al., 1998), ニトロセルロース膜に転写した。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 (ベリンガー社) を用い二次抗体を発光させた。この反応は、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。生じた光を X 線フィルムに感光させ、画像をコンピューターに取り込み、NIH-image を用い、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に含まれるカルボニル基の量を測定した。

#### 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 (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、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  $\mu\text{g}$  を含有) を 40°C で 2 時間インキュベートし、グリコーゲンをグルコースに分解した。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 20  $\mu\text{l}$  を加えた。暗所に 1 時間放置した後、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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に結合する fluorescein isothiocyanate (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  $\mu\text{g}$  を含むミ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  $\text{Na}_2\text{ATP}$ 、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コンピュー

ターに取り込み，NIH-image を用い，SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に結合した FITC の量を測定した。

#### 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. 実験結果

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

Fig. 9 に，SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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。

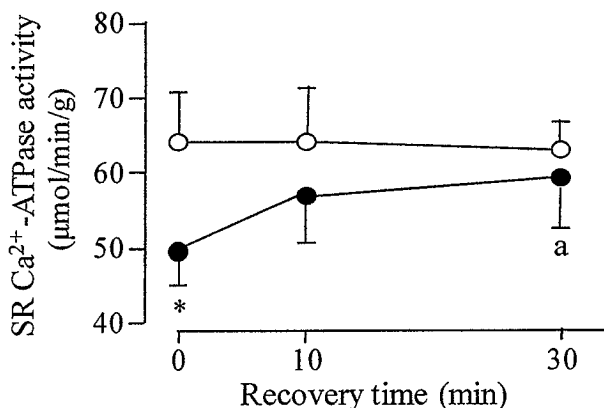


Fig. 9. Changes in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction. The intact gastrocnemius muscle from the one leg of each rat was fatigued by 5-min intermittent tetani evoked by electrical stimulation (100-msec trains at 75 Hz every 2 sec) via sciatic nerve. Values are means  $\pm$  SE (n = 8). \* $P$  < 0.05, vs control. <sup>a</sup> $P$  < 0.05, vs 0 min.

#### 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

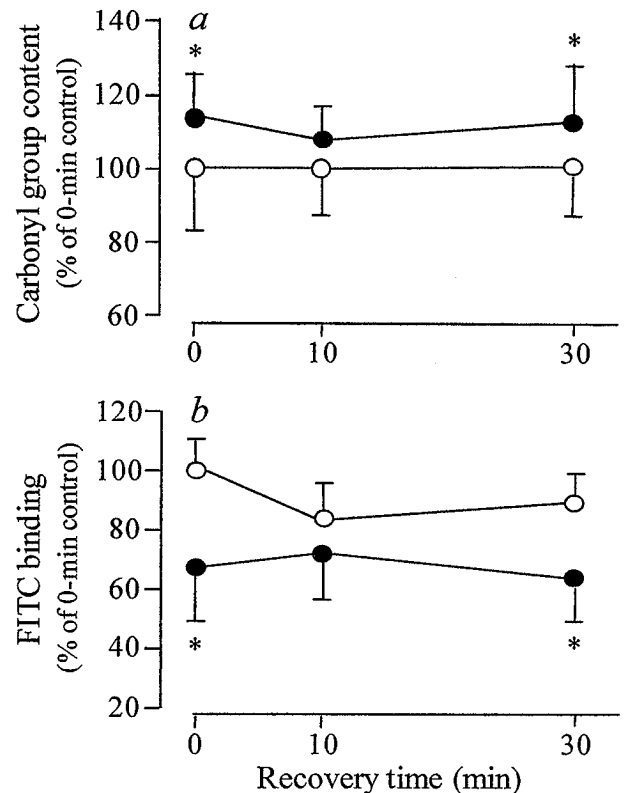


Fig. 10. Changes in carbonyl group content contained in sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (a) and FITC binding to SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (b) in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction. For treatment of animals, see legend of Fig. 9. Values are means  $\pm$  SE (n = 8), expressed as percentages of 0-min control. \* $P$  < 0.05, vs control. FITC, fluorescein isothiocyanate.

30 分後に，Cont 側に対し Stim 側において有意な高値が (Fig. 10a)，また FITC 量については，収縮終了直後および 30 分後に，Cont 側に対し Stim 側において有意な低値が観察された (Fig. 10b)。

#### C. グリコーゲン量およびグリコーゲンフォスフォリラーゼ量

SR に付着するグリコーゲン量は (Fig. 11a)，収縮終了直後および 10 分後に，Cont 側に対し Stim 側において，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 分後に，有意な低値が観察された。GP の量は，収縮終了直後および 10 分後に，Cont 側に対し Stim 側において，また Cont 側間の比較では，収縮終了直後に対し 30 分後に，有意な低値が認められた (Fig. 11b)。

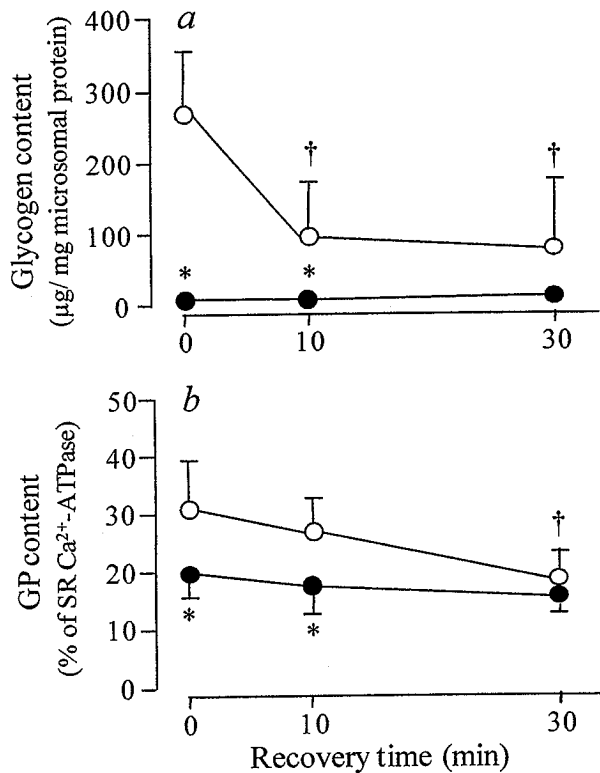


Fig. 11. Changes in glycogen and glycogen phosphorylase (GP; *b*) in control (open circle) and stimulated (filled circle) muscles during recovery after 5-min contraction. For treatment of animals, see legend of Fig. 9. Values are means  $\pm$  SE ( $n = 8$ ). \* $P < 0.05$ , vs control. † $P < 0.05$ , vs 0-min.

#### 4. 考 察

収縮終了直後に、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の低下および SR Ca<sup>2+</sup>-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 (Klebl et al., 1998; Matsunaga et al., 2001) あるいは疲労困憊に至る走行後 (Matsunaga et al., 2003; Matsunaga et al., 2008) について検討した報告と一致する結果である。これらの知見から Klebl et al. (1998) は、収縮に伴って発生する ROS によって、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase タンパクが酸化修飾を受けることが、この酵素の活性が低下する素因であろうと述べている。FITC は、SR Ca<sup>2+</sup>-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。ROS への曝露 (Favero et al., 1998) および激しい収縮活動 (Leberer et al., 1987;

Luckin et al., 1991) によって活性が低下した SR Ca<sup>2+</sup>-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考えられてきた。しかしながら本実験では、収縮後の回復期では、カルボニル基の含有量も FITC の結合量も SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性と同期して変化するわけではないことが観察され、これら2つの因子は活性低下の直接の原因でないことが示唆された。

1967 年の Bergström (Bergstrom et al., 1967; Bergstrom and Hultman, 1967) 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では、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で機能する種々の 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<sup>2+</sup>-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. 11 示されるように、SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性が回復した運動終了 30 分

後では, SR グリコーゲン量と 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の値が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が, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が回復した 30 分後の Stim 側では, 収縮直後と比べ両パラメーターに差異はみられず, これらが活性に影響している可能性は低いと思われる.

## 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)  $\text{Ca}^{2+}$ -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) 側として用い生化学的分析を行い, 以下の結果を得た.

1. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は, Cont 側と比べ Stim 側において, 収縮終了直後に有意な低値が認められた. しかしながら, 収縮終了 10 分および 30 分後では, 両群間に差異は観察されなかった
2. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に含まれるカルボニル基の量は, 収縮終了直後および収縮終了 30 分後に, Cont 側と比べ Stim 側において, 有意な高値が認められた.
3. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase への fluorescein isothiocyanate 結合量は, 収縮直後および刺激終了 30 分後に, Cont 側に対し Stim 側において, 有意な低値が観察された.
4. ミクロソームに含まれるグリコーゲン量およびグリコーゲンフォスホリラーゼ量は, 収縮直後および刺激終了 10 分後に, Cont 側に対し Stim 側において, 有意な低値がみられた.

以上の結果より, 収縮活動に起因して生ずる SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下に, タンパクの酸化および ATP 結合部位の構造的な変化は直接関与していないことが示唆された.

## References

- Bergström J, Hermanson L, Hultman E and Saltin B (1967). Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand* **71**, 140-150.
- Bergström J and Hultman E (1967). A study of the glycogen metabolism during exercise in man. *J Clin Lab Invest* **19**, 218-228.
- Bradford MM (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.
- Favero TG, Colter D, Hooper PF and Abramson JJ (1998). Hypochlorous acid inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Appl Physiol* **84**, 425-430.
- Klebl BM, Ayoub AT and Pette D (1998). Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett* **422**, 381-384.
- Leberer E, Hartner 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 SJ, Franks PD, Spangenburg EE and Williams JH (2001). Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* **91**, 1638-1644.
- Lees SJ and Williams JH (2004). Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum glycogen status influences  $\text{Ca}^{2+}$  uptake supported by endogenously synthesized ATP. *Am J Physiol* **286**, C97-C104.
- Luckin KA, Favero TG and Klug GA (1991). Prolonged exercise induces structural changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of rat muscle. *Biochem Med Metabol Biol* **46**, 391-405.
- Matsunaga S, Harmon S, Gohlsch B, Ohlendieck K

- and Pette D (2001). Inactivation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflügers Arch* **446**, 394-399.
- Matsunaga S, Mishima T, Yamada T, Inashima S and Wada M (2008). Alterations in in vitro function and protein oxidation of rat sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase during recovery from high-intensity exercise. *Exp Physiol* **93**, 426-433.



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

和田正信・三島隆章・松永 智・山田崇史・坂本 誠・杉山美奈子

### 1. 緒 言

Cuenda et al. (1991) は, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を増加させるよう作用すると考えられる. 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), GP はこの SR グリコーゲンに付着することで, SR に結合していることが知られている (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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の機能にマイナスの影響を与えると推測される (Lees et al., 2001).

実験 3 では, SR グリコーゲンおよび GP が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に及ぼす影響を *in situ* の実験から検証した. その結果, 収縮後の回復期間中に, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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 量が低下したこと, 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 の結果のみからは, 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思われた. そこで実験 4 では, SR グリコーゲンおよび GP が SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase に及ぼす影響をさらに明確にするために, グルコアミラーゼ (glucoamylase; GA) を用い, SR グリコーゲンを分解し, SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の機能およびその構造の変化を検討した.

### 2. 実験方法

#### A. 被検動物

実験には, 250~260 g の Wistar 系雄性ラット 6 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 20~24°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

麻酔下にて, 両脚の後肢から速筋を摘出した. SR のミクロソームは, 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 Ca<sup>2+</sup>-ATPase およ GP 含有量

ミクロソームに含まれる SR Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性

SR Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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。

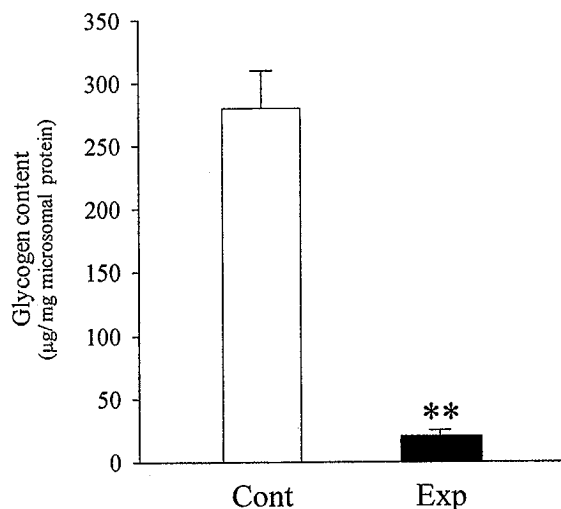


Fig. 12. Glycogen content associated with sarcoplasmic reticulum for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Experimental microsomes were exposed to glucoamylase to extract glycogen associated with SR membrane. Values are means ± SE (n = 6). \*\*P < 0.01, vs control.

#### 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. 実験結果

#### A. SR グリコーゲン量

Fig. 12 に、GA 処理が SR グリコーゲン量に及ぼす影響を示した。処理により 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 Ca<sup>2+</sup>-ATPase およびグリコーゲンフォスホリラーゼ量

GA 処理によって、ミクロソームに含まれる SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase のタンパク量に変化は認められなかった (Fig. 13)。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 23.8%であった。

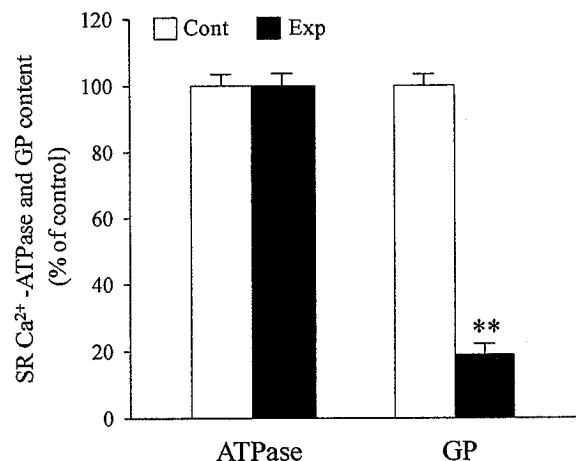


Fig. 13. Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase and glycogen phosphorylase (GP) content for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Treatment of experimental condition, see legend of Fig. 12. Values are means ± SE (n = 6), expressed as percentages of control. \*\*P < 0.01, vs control.

#### C. FITC 結合量

SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase に結合する FITC の量は、GA 処

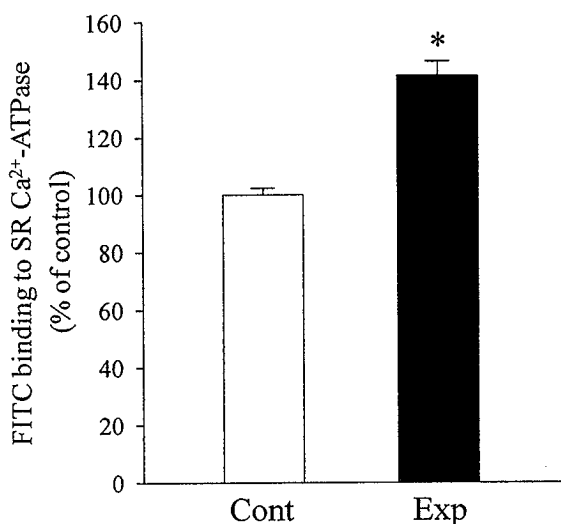


Fig. 14. FITC binding to sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Treatment of experimental condition, see legend of Fig. 12. Values are means ± SE (n = 6), expressed as percentages of control. \*P < 0.05, vs control.

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. 14)。

#### D. SR Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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. 15)。

#### 4. 考 察

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、最大酸素摂取量の 60~85% に相当する運動強度においては、筋グリコーゲンの枯渇することが、筋疲労を誘起する主な原因であることが明らかにされた (Ahlborg et al., 1967; Bergstrom et al., 1967; Bergstrom and Hultman, 1967; Hermansen et al., 1967; Karlsson and Saltin, 1971)。その後、多くの研究者がそのメカニズムを解明しようと試みたが、現在の段階でもなお明確

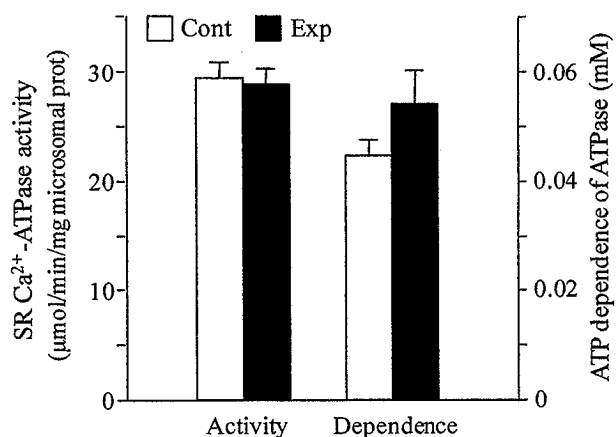


Fig. 15. Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and ATP dependence of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase for control (Cont) and glycogen-extracted (Exp) conditions. Treatment of experimental condition, see legend of Fig. 12. The ATP dependence represents the ATP concentration needed to obtain half-maximum activity. Values are means ± SE (n = 6).

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<sup>2+</sup>-ATPase 活性の低下には、FITC 結合量の低下が付随すること (Leberer et al., 1987; Byrd et al., 1990)、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 から解離すること (Lees et al., 2001)、3) SR 膜に付着する GP の量が増加すると、FITC の結合量が増加すること (Cuenda et al., 1991) 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<sup>2+</sup>-ATPase 活性の低下あるいは SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase の ATP に対する親和性の低減が誘起されると推測されてきた。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<sup>2+</sup>-ATPase 活性に影響しないことを明示するものである。また、SR Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup>-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; Byrd et al., 1990)。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  $\text{Ca}^{2+}$ -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 の膜のみならず横行小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すことが報告されている (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、1) ジヒドロピリジン受容体から SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルへのシグナルの伝達不全、2) 放出チャネル自身の機能の低下のどちらか一方あるいは両方の変化が生じ、このことがグリコーゲンの枯渇が筋疲労を招来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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -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観察されており (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) に付着するグリコーゲン (SR グリコーゲン) が、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の構造および SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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フォリラーゼ (GP) の量、SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase への fluorescein isothiocyanate (FITC) の結合量および SR  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性および ATP に対する酵素の親和性に、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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に影響を及ぼさないことが示唆された。

## References

- Ahlborg BJ, Bergström J, Ekelund L-G and Hultman E (1967). Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol Scand* **70**, 129-142.
- Bergström J, Hermanson L, Hultman E and Saltin B (1967). Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand* **71**, 140-150.
- Bergström J and Hultman E (1967). A study of the glycogen metabolism during exercise in man. *J Clin Lab Invest* **19**, 218-228.
- Byrd SK, Hodgson DR and Gollnick PD (1990). Effects of exercise on the ATP binding site of the sarcoplasmic reticulum (SR) ATPase (Abstract). *Med Sci Sports Exerc* **22**, S108.
- Chin ER and Allen DG (1997). Effects of reduced muscle glycogen concentration on force,  $\text{Ca}^{2+}$  release and contractile protein function in intact mouse skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* **497**, 17-29.
- Cuenda A, Centeno F and Gutierrez-Merino C (1991). Modulation by phosphorylation of glycogen phosphotylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett* **283**, 273-276.
- 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.
- Hermansen L, Hultman E and Saltin B (1967). Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta Physiol Scand* **71**, 129-139.
- Karlsson J and Saltin B (1971). Diet, muscle glycogen, and endurance performance. *J Appl Physiol* **31**, 203-206.
- Leberer E, Hartner 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 SJ, Franks PD, Spangenburg EE and Williams JH (2001). Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* **91**, 1638-1644.
- Okamoto K, Wang W, Rounds J, Chambers EA and Jacobs DO (2001). ATP from glycolysis is required for normal sodium homeostasis in resting fast-twitch rodent skeletal muscle. *Am J Physiol* **281**, E479-E488.