

伸張性収縮による骨格筋の機能低下の要因

神 崎 圭 太

くらしき作陽大学食文化学部

Mechanisms of skeletal muscle fatigue following eccentric contractions

Keita KANZAKI

Faculty of Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

Abstract: It is well-known that eccentric contractions (Ecc), in which muscles are stretched while contracting, result in immediate and prolonged force depressions. However, the mechanisms underlying this type of fatigue were not fully understood. The present study tested the hypothesis that long-lasting muscle fatigue following Ecc would be attributable to the functional deficit in sarcoplasmic reticulum (SR) and myofibril through the protein degradation by the calpain pathway. To this end, rat extensor digitorum longus and tibialis anterior muscles were exposed to 200-repeated contractions and used for measures of force output and for biochemical analyses, respectively.

The experiment 1 showed that the SR Ca^{2+} release and uptake rate, the myofibrillar ATPase activity and the relative content of myosin heavy chain were decreased 4-6 days after Ecc, but not immediately after Ecc. These alterations were specific for Ecc and not observed for isometric contractions. These results imply that functional impairment in the SR and myofibril may contribute, at least partly, to Ecc-induced muscle

fatigue which can take a number of days to recover.

In the experiment 2, several (3-6) days after Ecc, decreases in the SR Ca^{2+} release and uptake rate were observed to be accompanied by reductions in the protein contents of SR Ca^{2+} release channel and Ca^{2+} -ATPase, suggesting that disturbances in Ca^{2+} uptake and release would result from the degradation of corresponding molecules.

Skeletal muscle expresses mainly three distinct calpain isoforms, i.e., μ -calpain, m-calpain and calpain-3. The experiment 3 revealed that all three isoforms were autolyzed following Ecc. Calpain-3 was autolyzed earlier than μ -calpain, while μ -calpain was autolyzed earlier than m-calpain.

In the experiment 4, specific inhibition of μ -calpain and m-calpain with the infusion of MDL-28170 was found to attenuate a loss of force production and reductions in SR and myofibrillar function 3 days after Ecc. These findings in the present study suggest that long-lasting force depressions following Ecc may stem from calpain-mediated degradation of proteins involved in excitation-contraction coupling.

I 章 緒 言

一般に、「継続的な筋収縮活動に伴い、骨格筋が発揮する張力あるいはパワーが低下する現象」は筋疲労と呼ばれる。等尺性収縮や短縮性収縮に比べ、伸張性収縮 (eccentric contraction: Ecc) では、筋疲労からの回復に長時間を要することが知られている (Lavender and Nosaka, 2006)。この原因の1つは、興奮・収縮連関の機能の低下にあると考えられている (Warren et al., 2001)。

筋原線維と筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum: SR) は、興奮・収縮連関において重要な役割を果たしており、前者は収縮運動を直接起こす機能を、後者は筋形質の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の調節を介して、筋原線維の収縮・弛緩を制御する機能を有している。先行研究では、Eccがこれらの細胞内小器官に及ぼす影響が検討されてきたが (Ingalls et al., 1998a, b)、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain: MHC) の頭部に位置する筋原線維 ATPase (myofibrillar ATPase: myo-ATPase) の活性が変化するか否か、あるいはSRの機能が収縮終了後のどの時期に低下するのかについては明らかになっていない。また、機能低下の原因が、筋原線維やSRを構成するタンパクの量的減少にあるかどうかとも明確にはなっていない。

カルパインは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇によって活性化されるタンパク分解酵素である (Goll et al., 2003)。Ecc後には、安静時の筋形質 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することが認められており (Lynch et al., 1997)、Ecc後の筋タンパクの減少には、カルパインが関与すると考えられている (Belcastro et al., 1998; Zhang et al., 2008)。しかしながら、Ecc後にカルパインが活性化されるか否か、また活性化されるとすれば、その現象がEccによって生ずるSRや筋原線維の機能の変化を直接招来するか否かについては不明である。

そこで本研究では、「Eccによって活性化されたカルパインが、SRや筋原線維を構成するタンパクを分解するために筋疲労が起こる」という仮説を検討することを主な目的とした。

II 章 文献研究

先行研究から得られた知見を、1) 伸張性収縮が骨格筋の収縮機能に及ぼす影響、2) 興奮・収縮連関に関与する細胞内小器官の構造と機能、3) カルパイン、および4) 筋収縮活動が筋小胞体、筋原線維ATPaseおよびカルパインに及ぼす影響に分類し、総説した。

III 章 実験の目的および課題

本章では、設定した4つの実験課題とその目的について述べた。

IV 章 伸張性収縮が筋小胞体の機能、筋原線維ATPase活性およびカルパイン活性に及ぼす影響 — 等尺性収縮との比較 — (実験1)

実験1では、Ecc後の回復期において、SRの機能、myo-ATPase活性および総カルパイン活性の経時的变化を検討することを目的とした。また、これらの変化がEcc後に特異的な現象であるかどうかを検討するために、等尺性収縮との比較も行った。

Wistar系雄性ラットを、等尺性収縮 (isometric contraction: Iso) 群とEcc群の2群に分類した。Iso群には等尺性収縮を、Ecc群にはEccを片脚 (stimulation group: Stim群) に200回負荷した。反対脚 (Rest群) はコントロールとして用いた。なお、Eccは伸展装置を用いて、また等尺性収縮は膝関節角度を90°に固定した状態で、坐骨神経を電気刺激することによって収縮を誘起した。収縮終了直後、2日後、4日後および6日後に、長指伸筋と前脛骨筋を摘出し、分析に供した。

Ecc群では、Rest群と比べStim群において、最大等尺性収縮力、SR Ca^{2+} 放出・取り込み機能およびmyo-ATPase活性が、収縮終了4日目以降に有意な低値を示した。これらの結果は、SRの機能やmyo-ATPase活性の低下が、Ecc後に長期にわたって生じる筋疲労の原因の1つであることを示唆する。また、Ecc群では、Rest群に比べStim群において、MHCのタンパク量が、収縮終了6日後

で低値を示し、myo-ATPase活性の低下の原因の1つが、MHCの量的減少にあることが示唆された。さらに、Ecc群では、Rest群に比べStim群において、総カルパイン活性が、SRの機能やmyo-ATPase活性が低下した時期に高値を示した。この結果からは、これらの低下にカルパインが関与していることが推察される。また、本実験では、SRの機能、myo-ATPase活性および総カルパイン活性の変化が、Iso群では観察されず、Ecc群に観察された変化がEccに特異的な現象であることも明らかとなった。

V章 伸張性収縮が筋小胞体の機能およびタンパク量に及ぼす影響 (実験2)

実験2では、SRの機能低下の原因が、関連するタンパクの量的減少にあるか否かを検討することを目的とした。実験1と同様の方法を用いて、Wistar系雄性ラットの片脚 (Ecc群) に200回のEccを負荷した。反対脚 (Rest群) はコントロールとして用いた。Ecc終了直後、3日後および6日後に、長指伸筋と前脛骨筋を摘出し、分析に供した。

SR Ca^{2+} 放出機能の低下率とSR Ca^{2+} 放出チャネル (Ca^{2+} release channel: CRC) のタンパク量の減少率との間、および Ca^{2+} 取り込み機能の低下率とSR Ca^{2+} -ATPaseのタンパク量の減少率との間に有意な正の相関関係が認められた。これらの結果から、Ecc終了数日後に観察されるSRの機能低下の原因の1つは、関連するタンパクの量的減少にあることが示唆された。

VI章 伸張性収縮がカルパインの自己分解に及ぼす影響 (実験3)

実験3では、Ecc後の回復期において、 μ -カルパイン、m-カルパインおよびカルパイン-3の自己分解の程度 (カルパインの活性化の指標) を検討することを目的とした。

実験1と同様の方法を用いて、Wistar系雄性ラットの片脚 (Ecc群) に200回のEccを負荷した。反対脚 (Rest群) はコントロールとして用いた。Ecc終

了直後、3日後および6日後に、前脛骨筋を摘出し、分析に供した。

本実験では、1) Rest群に比べEcc群において、自己分解型カルパイン-3の量が収縮終了直後、3日後および6日後で高値を示すこと、2) Rest群に比べEcc群において、自己分解型 μ -カルパインの量が、収縮終了3日後および6日後で高値を示すこと、および3) m-カルパインの自己分解は、収縮終了6日後のEcc群のみで起こることが観察された。これらの結果は、Ecc後においては、カルパイン-3、 μ -カルパイン、m-カルパインの順で活性化が起こることを示すものである。

VII章 カルパインの障害が伸張性収縮後の骨格筋の機能に及ぼす影響 (実験4)

実験1、2および3の結果からは、Ecc後に活性化したカルパインが、CRC、SR Ca^{2+} -ATPaseおよびMHCを分解することが原因で、SRの機能やmyo-ATPase活性が低下するという仮説が考えられる。そこで実験4では、 μ -カルパインとm-カルパインの特異的阻害剤を用いて、この仮説の妥当性を検討することを目的とした。

Wistar系雄性ラットを阻害剤投与 (calpain inhibition: CI) 群とコントロール (control: CON) 群の2群に分類した。CI群には10.0 mg/kg body weightのMDL-28170を腹腔より投与した。実験1と同様の方法を用いて、ラットの片脚 (Ecc群) にEccを負荷した。反対脚 (Rest群) はコントロールとして用いた。収縮終了3日後に長指伸筋と前脛骨筋を摘出し、分析に供した。

Ecc群の総カルパイン活性は、CON群に対してCI群で低値を示し、そのレベルはCON群のRest群と同程度であった。この結果は、Ecc終了後にCI群では、カルパイン活性が正常レベルに維持されていたことを示唆する。CON群では、Rest群に比べEcc群において、最大等尺性収縮力、SR Ca^{2+} 放出・取り込み機能およびmyo-ATPase活性が低値を示したが、CI群では差異はみられなかった。これらの結果は、 μ -カルパインおよびm-カルパインのいずれか一方または両方が、SRや筋原線維の

機能に関連するタンパクを分解することが原因で、Ecc後に長期的な筋疲労が生じることを示唆する。

VIII章 討 論

筋疲労のメカニズムは、多くの筋生理学者の関心の的となっている。1世紀以上にわたる研究の結果、持久的運動ではグリコーゲンの枯渇などが、高強度運動では代謝副産物の蓄積などが、筋疲労を誘起する要因として示されてきた (Allen et al., 2008)。これらが原因で起こる筋疲労は、通常、運動終了から数時間以内に回復する。これに対して、回復に数日を要するタイプの筋疲労もあり、この種の筋疲労は短縮性収縮や等尺性収縮に比べて、Eccを多く含む運動後に起こりやすいことが認められている (Lavender and Nosaka, 2006)。本研究では、Eccに起因して生じる筋疲労のメカニズムを明らかにするために、4つの実験を行った。その結果、骨格筋のタンパク分解経路の中でもカルパイン系が、興奮・収縮連関に重要な役割を果たすタンパクを分解することが、Ecc後に長期的な筋疲労が生じる原因の1つであることが示唆された。本研究で用いたカルパイン阻害剤は、動物実験にのみ用いることのできる試薬であり、これをヒトへ投薬することはできない。先行研究では、大豆タンパクを多く含む食餌をラットに摂取させると、カルパインの内因性阻害剤であるカルパスタチンの活性が増加することが報告されている (Nikawa et al., 2002)。今後はこのようなモデルにおいても、Eccに起因して生じる筋疲労が抑制されるか否かを検討する必要がある。

参考文献

- Allen, D. G., Lamb, G. D. & Westerblad, H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*, **88**, 287-332.
- Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D. & Raj, D. A. (1998). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **179**, 135-145.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological Reviews*, **83**, 731-801.
- Ingalls, C. P., Warren, G. L. & Armstrong, R. B. (1998a). Dissociation of force production from MHC and actin contents in muscles injured by eccentric contractions. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **19**, 215-224.
- Ingalls, C. P., Warren, G. L., Williams, J. H., Ward, C. W. & Armstrong, R. B. (1998b). E-C coupling failure in mouse EDL muscle after in vivo eccentric contractions. *Journal of Applied Physiology*, **85**, 58-67.
- Lavender, A. P. & Nosaka, K. (2006). Changes in fluctuation of isometric force following eccentric and concentric exercise of elbow flexors. *European Journal of Applied Physiology*, **96**, 235-240.
- Lynch, G. S., Fary, C. J. & Williams, D. A. (1997). Quantitative measurement of resting skeletal muscle $[Ca^{2+}]_i$ following acute and long-term downhill running exercise in mice. *Cell Calcium*, **22**, 373-383.
- Nikawa, T., Ikemoto, M., Sakai, T., Kano, M., Kitano, T., Kawahara, T., Teshima, S., Rokutan, K. & Kishi, K. (2002). Effects of a soy protein diet on exercise-induced muscle protein catabolism in rats. *Nutrition*, **18**, 490-495.
- Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A. & Armstrong, R. B. (2001). Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, **29**, 82-87.
- Zhang, B. T., Yeung, S. S., Allen, D. G., Qin, L. & Yeung, E. W. (2008). Role of the calcium-calpain pathway in cytoskeletal damage after eccentric contractions. *Journal of Applied Physiology*, **105**, 352-357.