

# 博士論文

## 速筋における低頻度疲労の発生メカニズム

-筋原線維の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性と筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能に着目して-

(要約)

平成 29 年 3 月

広島大学大学院 総合科学研究科 総合科学専攻

渡邊 大輝

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 要約  | 1  |
| 第1章 緒言                                      | 4  |
| 1. 先行研究                                     | 4  |
| A. 興奮収縮連関                                   | 4  |
| B. 興奮収縮連関に主要な役割を果たす細胞内小器官                   | 6  |
| a. 筋小胞体                                     | 6  |
| b. 筋原線維                                     | 8  |
| C. 低頻度疲労とは                                  | 8  |
| D. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と張力の関係            | 10 |
| E. 低頻度疲労の原因                                 | 14 |
| F. 低頻度疲労に用いられてきた手法                          | 14 |
| a. インタクトファイバー                               | 17 |
| b. スキンドファイバー                                | 17 |
| c. 筋小胞体小胞                                   | 20 |
| G. 低頻度疲労に関与するタンパク質                          | 21 |
| a. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能に関与するタンパク質     | 21 |
| a-1. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ | 21 |
| a-2. ジヒドロピリジン受容体                            | 23 |
| a-3. リアノジン受容体                               | 24 |
| a-4. カルセクエストリン                              | 25 |
| a-5. ジャンクトフィリン                              | 26 |
| a-6. トライアジン                                 | 26 |
| a-7. トリメトリック細胞内陽イオンチャンネル                    | 27 |
| a-8. ミツグミン 29                               | 27 |
| a-9. ジャンクシヨナルフェースプロテイン 45                   | 27 |
| a-10. ジャンクチン                                | 28 |
| a-11. Stac3                                 | 28 |
| b. 筋原線維の $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に関与するタンパク質     | 28 |
| b-1. ミオシン重鎖                                 | 28 |
| b-2. ミオシン軽鎖                                 | 29 |
| b-3. トロポニン                                  | 29 |

|  |    |
|--|----|
| H. 低頻度疲労に伴う筋小胞体および筋原線維の機能低下の要因                     | 30 |
| a. 活性酸素種の増加  | 30 |
| b. $\text{Ca}^{2+}$ 依存性プロテアーゼの活性化                  | 33 |
| c. 代謝産物の蓄積   | 34 |
| d. 筋グリコーゲン量の減少                                     | 35 |
| e. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の低下                    | 36 |
| 2. 先行研究における問題点                                     | 37 |
| 3. 本研究の目的  | 38 |
|  |    |
| 第2章 生体内における低頻度疲労の発生要因—回復早期について—                    |    |
| (実験1)  | 40 |
| 1. 目的  | 40 |
| 2. 方法  | 41 |
| A. 被験動物および実験プロトコール                                 | 41 |
| B. スキンドファイバーを用いた測定                                 | 42 |
| a. スキンドファイバーの作製および溶液                               | 42 |
| b. 電気刺激誘因性張力                                       | 42 |
| c. RyRのカフェイン感受性                                    | 44 |
| d. 筋原線維 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性                       | 45 |
| e. DTDP+GSH 処置                                     | 45 |
| C. 全筋を用いた測定  | 46 |
| a. RyRの4-クロロ-m-クレゾール感受性                            | 46 |
| b. ミオシン軽鎖2のリン酸化量                                   | 47 |
| c. トロポニンIに含まれるグルタチオン量                              | 48 |
| D. 統計処理  | 51 |
| 3. 結果  | 51 |
| A. 全筋およびスキンドファイバーにおける張力                            | 51 |
| B. 筋原線維 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性およびトロポニンIにおける S-glut 量 | 53 |
| C. RyRのカフェイン感受性および4-クロロ-m-クレゾール感受性                 | 53 |
| 4. 考察  | 60 |
| 5. 要約  | 63 |
|  |    |
| 第3章 回復期における低頻度疲労の発生要因の変化 (実験2)                     | 65 |

|  |    |
|--|----|
| 1. 目的  | 65 |
| 2. 方法  | 66 |
| A. 被験動物および実験プロトコール                                   | 66 |
| B. スキンドファイバーを用いた解析                                   | 67 |
| a. スキンドファイバーの作製および溶液                                 | 67 |
| b. 電気刺激誘因性張力   | 67 |
| c. 脱分極誘因性張力  | 67 |
| d. RyR のカフェイン感受性                                     | 68 |
| e. 筋原線維の $\text{Ca}^{2+}$ 感受性, DTDP+GSH 処置および DTT 処置 | 68 |
| C. 全筋を用いた解析  | 69 |
| a. RyR のリン酸化量  | 69 |
| b. トロポニン I に含まれるグルタチオン量                              | 70 |
| D. 統計処理  | 70 |
| 3. 結果  | 70 |
| A. 全筋の張力   | 70 |
| B. スキンドファイバーの電気刺激誘因性張力                               | 72 |
| C. スキンドファイバーの脱分極誘因性張力とカフェイン感受性                       | 72 |
| D. RyR のリン酸化量  | 75 |
| E. 筋原線維 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性                         | 75 |
| F. DTDP+GSH 処置および DTT 処置が $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に及ぼす影響 | 78 |
| G. トロポニン I に含まれるグルタチオン量                              | 78 |
| 4. 考察  | 83 |
| 5. 要約  | 85 |

#### 第4章 低頻度疲労に伴う筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能低下の要因—筋小胞体

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に着目して— (実験 3) | 89 |
| 1. 目的                                | 89 |
| 2. 方法                                | 90 |
| A. 被験動物および実験プロトコール                   | 90 |
| B. スキンドファイバーを用いた解析                   | 90 |
| a. スキンドファイバーの作製                      | 90 |
| b. 内在性筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 含有量      | 91 |
| c. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み機能      | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| d. 筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出の測定                                      | 92  |
| e. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の阻害が筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に及ぼす影響 | 93  |
| f. DHPR の不活性化が筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に及ぼす影響                        | 94  |
| C. 全筋を用いた解析  | 95  |
| a. SR 小胞を用いた筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出の測定                             | 95  |
| b. SR 小胞膜の $\text{Ca}^{2+}$ 透過性  | 96  |
| c. RyR1 のリン酸化量   | 97  |
| d. RyR1 の Ser2844 におけるリン酸化量  | 98  |
| e. RyR1 に含まれるカルスタビン量   | 99  |
| f. 断片化した RyR1 量  | 100 |
| D. 脱リン酸化処置が筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に及ぼす影響                           | 101 |
| E. 統計処理  | 101 |
| 3. 結果  | 102 |
| A. 張力  | 102 |
| B. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能力および内在性筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 含有量         | 104 |
| C. 筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出量  | 104 |
| D. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を介した筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出       | 104 |
| E. RyR を介した筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出                                 | 108 |
| a. DHPR との相互作用がない場合  | 108 |
| b. DHPR との相互作用がある場合  | 108 |
| F. RyR のリン酸化およびカルスタビン結合量   | 110 |
| G. RyR の断片化  | 110 |
| H. 脱リン酸化が筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に及ぼす影響                                | 113 |
| 4. 考察  | 113 |
| 5. 要約  | 118 |
| <br>   |     |
| 第5章 討論   | 122 |
| 1. 回復期における低頻度疲労発生要因の変化   | 122 |
| 2. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下の要因                                    | 122 |
| A. RyR の機能の低下  | 122 |
| B. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の低下  | 125 |
| 3. 筋原線維 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の変化  | 126 |

|   |     |
|---|-----|
| 4. 今後の展望と課題   | 127 |
| A. 伸張性収縮における低頻度疲労の発生要因                                  | 127 |
| B. 遅筋における低頻度疲労の発生要因                                     | 128 |
| C. 筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能低下の要因                      | 129 |
| D. GSH 量の変化が低頻度疲労に及ぼす影響                                 | 130 |
| E. DHPR による RyR の制御が老化や筋疾患に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に及ぼす影響 | 130 |
| 第 6 章 総括  | 131 |
| 謝辞  | 134 |
| 参考文献  | 135 |

## 要 約

電気刺激によって筋を刺激すると、刺激頻度の増加に伴って張力は増加するが、一定の刺激頻度に達すると張力の増加率は緩慢となる。刺激頻度の増加に伴って張力が著しく増加する刺激領域は低頻度領域と、張力の増加がほぼプラトーになる刺激領域は高頻度領域と呼ばれる。低頻度疲労とは、高頻度誘因性張力と比較し、低頻度誘因性張力の方が大きく低下する現象のことであり、長期にわたって継続することに特徴がある。これまで低頻度疲労の発生要因は、筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の低下か筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下のどちらか一方、あるいは両方にあるといわれてきた。しかしながら、これらの知見は試験管内で行われた実験に基づいており、生体内で同様の現象が生じるか否かについては明らかでない。そこで本研究では、この点を明らかにすることを目的とし、3つの実験を行った。

実験1では、生体内における低頻度疲労の要因が、筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の低下と筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下の両方にあるかどうかについて検討することを目的とした。坐骨神経を介した電気刺激（刺激頻度 70 Hz、刺激間隔 0.35 ミリ秒、3 秒に 1 回）によって、Wistar 系雄性ラットの片脚の腓腹筋に対し、張力が初期値の 50%に低下するまで収縮を負荷した。収縮終了 30 分後に腓腹筋を摘出し、スキンドファイバーおよび全筋のホモジナイズを用いた解析を行った。なお、反対脚はコントロールとして使用した。解析の結果、回復早期段階においては、低頻度疲労の原因は、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下であること、また、その原因はリアノジン受容体（筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出

チャンネル)の開口確率の低減にあることが明らかとなった。さらに、この時期には、トロポニン I における *S*-glutathionylation (*S*-glut) 量の増加に起因して、筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性は高まることが認められた。

実験 2 では、低頻度疲労の回復期において、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能と筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の 2 つ変化が、低頻度疲労に対して、どのように影響するのかを経時的に明らかにすることを目的とした。実験 1 と同様の方法で、Wistar 系雄性ラットの腓腹筋に低頻度疲労を発生させた。収縮終了 0 時間、0.5 時間、2 時間、6 時間および 12 時間後に筋を摘出し、スキンドファイバーおよび全筋のホモジナイズを用いた解析を行った。その結果、低頻度疲労の主な原因は、回復早期段階では、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下であること、これに対して回復後期段階では、筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の低下であることが明らかとなった。さらに、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下には、脱リン酸化によるリアノジン受容体の開口確率の低下が、また、筋原線維  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の変動には、トロポニン I における *S*-glut 量の変化が関与することが認められた。

実験 3 では、筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に着目して、低頻度疲労に伴う筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能低下の要因を明らかにすることを目的とした。実験 1 および 2 と同様の方法で、Wistar 系雄性ラットの腓腹筋に低頻度疲労を発生させた。収縮終了 30 分後に筋を摘出し、スキンドファイバーおよび全筋のホモジナイズを用いた解析を行った。その結果、低頻度疲労に伴う筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能の低下の原因の一つは、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の低減であること、 $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の低下の原因は、リアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出量の増加であ

ること、およびリアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出はジヒドロピリジン受容体の不活性化によって起ることが明らかとなった。

生体内における低頻度疲労の発生メカニズムを明らかにした研究は、本研究が最初である。本研究で得られた知見は、ヒトが日常的に感じる筋疲労を軽減する方策の開発に対して、重要な示唆を与えるものであり、クオリティ・オブ・ライフの向上に寄与すると考えられる。

## 論文目録

本論文は以下に示す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。

**Watanabe D and Wada M.** Predominant cause of prolonged low-frequency force depression changes during recovery after in situ fatiguing stimulation of rat fast-twitch muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311: R919-R929, 2016.

**Watanabe D, Kanzaki K, Kuratani M, Matsunaga S, Yanaka N and Wada M.** Contribution of impaired myofibril and ryanodine receptor function to prolonged low-frequency force depression after in situ stimulation in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 36: 275-286, 2015.