

筋疲労に伴う筋小胞体の機能の変化およびその要因

松永 智

広島大学大学院生物圏科学研究科

Mechanisms underlying contraction-induced decreases in sarcoplasmic reticulum function in rat skeletal muscle

Satoshi MATSUNAGA

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

I. 緒 言

筋原線維の収縮・弛緩は、細胞内遊離Ca²⁺濃度によって制御されており、哺乳類骨格筋では、このCa²⁺濃度は筋小胞体（Sarcoplasmic reticulum : SR）によって調節されている。筋収縮が繰り返されると、発揮される張力の低減や筋収縮速度や弛緩速度の低下が起こる。この現象は一般に「筋疲労」と呼ばれ、その原因の1つがSRの機能が低下することにあるとされているが、そのメカニズムについては明確にはなっていない。

SRの縦走管上にはCa²⁺依存性ATPase（SR Ca²⁺-ATPase）が存在し、ATPを使用してCa²⁺を筋形質からSR内腔へと輸送する。in vitroの実験において、1）酸化作用を有する試薬にSRを曝露すると、SR Ca²⁺-ATPase活性が著しく低下すること、また2）激しい筋収縮を行うと、細胞内の活性酸素（Reactive oxygen species: ROS）の濃度が増加することが明らかになっており、これらのことから、収縮に起因して発生するROSがSRのCa²⁺取り込み能力の低下を誘起している可能性が考えられる。収縮に起因してSR Ca²⁺-ATPaseタンパクが酸化されることは、筋を電気刺激により外部から強制的に収縮させる研究では示されてきたが、走運動のような通常行われる運動でも同様の現象が生じるか否かについては明らかにはなっていない。さらに、酸化によりアミノ酸が修飾を受けると、タンパクが分解されその結果タンパク量が減少し、このことがSR Ca²⁺-ATPase活性の低下を招来していることも推察される。

一酸化窒素（Nitric oxide : NO）は、生体の生理作用が正常に機能するうえで不可欠な物質であるが、条件によってはマイナスに作用することも指摘されている。筋活動量増大に伴い生体内でNOの生成が増加する事実からは、NOがSRのCa²⁺取り込み・放出機能に影響を及ぼしていることが示唆されるが、実際の運動局面におけるNOの作用については明らかにはなっていない。

そこで本研究では、1）筋活動量増大のモデルである慢性的低頻度電気刺激（Chronic low-frequency stimulation : CLFS）によるSR機能低下の要因について、Ca²⁺-ATPaseタンパクの量的変化に着目し検討すること、2）一過性の高強度走運動がSRのCa²⁺取り込み機能に及ぼす影響につい

て、Ca²⁺-ATPaseタンパクの酸化、タンパクの量的変化およびATP再合成系の変化に焦点をあて検討することを目的とし、以下の3つの研究課題を設定した。

- 実験1 CLFSによる筋小胞体Ca²⁺-ATPaseの活性およびタンパク量の変化
- 実験2 高強度運動が筋小胞体Ca²⁺-ATPaseに及ぼす影響—酸化状態に着目して—
- 実験3 高強度運動によるADP-PCr依存性筋小胞体Ca²⁺取り込み能力の変化

II. CLFSによる筋小胞体Ca²⁺-ATPaseの活性およびタンパク量の変化（実験1）

〔目的〕 CLFSを負荷した筋において、SR Ca²⁺-ATPaseタンパク量の変化がSR Ca²⁺-ATPase活性の低下に寄与している可能性を検証した。

〔方法〕 ウィスター系雄性ラットの前脛骨筋に、CLFS（10 Hz）を負荷した。12時間、24時間、あるいは48時間連続して刺激した後、これらの筋のSR Ca²⁺-ATPase活性を測定した。CLFSは左脚のみに負荷し、右脚の筋を対照群とした。筋サンプルの量的な問題から、これらからSR Ca²⁺-ATPase活性以外の測定を行うことはできなかった。そこで、別のラットの前脛骨筋に24時間CLFSを負荷し、それらを用いて免疫化学的測定を行った。

〔結果および考察〕 12時間以上CLFSを負荷することによって、SR Ca²⁺-ATPase活性が有意に低下することが観察された。24時間のCLFSによって、Ca²⁺-ATPaseタンパクのカルボニル基の量は2倍以上に増加し、SERCA1のタンパク量は有意に減少した。一方、ニトロチロシンの量には変化がみられなかった。これらの結果から、CLFSによるCa²⁺-ATPase活性の低下は、タンパクの酸化に加え、タンパク量の減少によってもたらされることが示唆された。

III. 高強度運動がSR Ca²⁺-ATPaseに及ぼす影響—酸化状態に着目して—（実験2）

〔目的〕 疲労困憊に至る高強度走運動によって起こるSR Ca²⁺-ATPase活性の低下に、Ca²⁺-ATPaseタンパクの酸化とタンパク量の変化が関与する可能性を検証した。

〔方法〕 実験にはウィスター系雄性ラットを用い、これらを対照群と運動群に分け、運動群には分速50m、上り勾配10%で疲労困憊に至る走運動を行わせた。運動直後に、外側広筋および腓腹筋を摘出し、両筋の表層部を測定に用いた。これらから、SR Ca²⁺-ATPaseタンパクのカルボニル基の含有量、メルカプト基の含有量、SR Ca²⁺-ATPaseタンパクの量、SERCA1タンパクの量、SR Ca²⁺-ATPase活性およびCa²⁺取り込み速度を測定した。

〔結果および考察〕 運動によって、SR Ca²⁺-ATPase活性に16%、Ca²⁺取り込み速度に34%の減少が認められたが、SR Ca²⁺-ATPase、SERCA1およびメルカプト基の量には変化がみられなかった。一方、SR Ca²⁺-ATPaseタンパクに含まれるカルボニル基の量は、約2倍以上に増大することが観察された。これらの結果から、SR Ca²⁺-ATPaseの酸化が酵素活性の低下に関与している可能性が示唆された。Ca²⁺-ATPaseのどの部位が酸化されたのかについては、本実験の結果から言及することはできないが、ATPaseに含まれるメルカプト基の数は運動によって変化しなかったことから、少なくともシステインがその対象ではないことが推察された。

IV. 高強度運動によるADP-PCr依存性筋小胞体Ca²⁺取り込み能力の変化（実験3）

〔目的〕 SRが利用するATPは、SRの膜に結合しているクレアチンキナーゼ（Creatine kinase：CK）

によっても供給されていることから、仮にSR Ca^{2+} -ATPase活性に変化がなくても、CK活性が低下すると Ca^{2+} の取り込みは低減すると考えられる。本実験では、走運動によるSRの Ca^{2+} の取り込み能力の変化をCKの変化に着目して検討した。

【方法】 ウィスター系雄性ラットを用いて、運動群と対照群に分け、運動群には実験2と同方法により疲労困憊に至る走運動を負荷した。被検筋には外側広筋表層部を用い、測定項目は Ca^{2+} -ATPase活性、 Ca^{2+} 取り込み速度、 Ca^{2+} 放出速度とした。 Ca^{2+} 取り込み速度は、反応溶液中の基質にATPのみを含んだ場合（以後、ATP- Ca^{2+} 取り込み速度と呼ぶ）と、ADPとPCrを含んだ場合（以後、ADP+PCr- Ca^{2+} 取り込み速度と呼ぶ）の2種類の 방법으로測定を行った。

【結果および考察】 ADP+PCr- Ca^{2+} 取り込み速度の低下率が、ATP- Ca^{2+} 取り込み速度と比較して大きかったことから、疲労困憊に至る運動によって、ATPaseだけではなくCKにも阻害が起こることが示唆された。in vitroでの先行研究では、SRにNOを付加するとADP+PCr- Ca^{2+} 取り込み速度は低下するが、ATP- Ca^{2+} 取り込み速度は変化しないことが示されている。彼らの結果は本実験の結果と類似しており、CK活性の低下にNOが関与している可能性が推察された。

V. 討 論

本研究では、SRの機能低下に筋収縮中発生するROSが及ぼす影響に着目して実験を行った。実験1ではCLFSを行った筋において、SR Ca^{2+} -ATPase活性が低下したのは、ATPaseタンパクが分解したためであることが示唆された。タンパク量の分解が高まった理由については、実験1から直接的な確証を得ることはできなかったが、先行研究においてアミノ酸が酸化されたタンパクでは異化が亢進することが認められていること、および本実験において酸化の指標となるカルボニル基の含有量がSR Ca^{2+} -ATPaseで増加したことから、タンパクの酸化が関与していることが示唆された。

実験2では、実験1で観察された同様の変化が、日常的に行われる走運動においても生じるかどうかを検証した。その結果CLFS負荷と同様、SR Ca^{2+} -ATPaseタンパクに酸化が生じることが認められたが、SR Ca^{2+} -ATPaseのタンパク量の変化はみられず、酸化を受けたことがタンパクの分解にまでは繋がらなかったことが示された。タンパク量の減少が酵素の触媒活性の低下を起こすことは明らかであるが、実験1では、酸化とタンパク量の減少の両方が起こったため、酸化それ自身が活性に及ぼす作用については明確ではなかった。しかしながら、実験2の結果からは、酸化が直接SR Ca^{2+} -ATPase活性の低下を引き起こしていることが示唆された。ROSの1つに分類されるNOも筋収縮中に生成され、この物質の作用によってCK活性が低下することが知られている。実験3では、CKが関わるATP再合成系がSRの Ca^{2+} ポンプ能力に及ぼす影響を検討し、走運動によるSRの Ca^{2+} 取り込み能力の低下に、この系の機能の低下も関与しているとの結果を得た。

本研究から得られた結果は、SRの Ca^{2+} ポンプ機能の低下を軽減するうえで、ROSによる影響を最小限に抑えることが効果的であることを示唆する。ROSの影響を低下させるためには、ROSの発生を抑えるか、発生したROSの作用を防御することが必要となるが、ROSはATP産生に関与する系から発生するため、収縮を継続する限りその産生量を低減することは不可能である。したがって、筋疲労の抑制には、ROSの作用に対する防御機能を高めることがその1つの方策となることが考えられる。