

筋肉の性質を変えるカルシウムと そのスポーツ科学への応用

聖マリアンナ医科大学 山下 勝 正
(共同研究者) 同 吉岡 利 忠

Calcium ion movements in skeletal muscle cells modify muscular contractile properties
— **Meaning of muscular calcium ion in sports sciences** —

by

Katsumasa Yamashita-Goto, Toshitada Yoshioka
Department of Physiology,
St. Marianna University School of Medicine

ABSTRACT

We examined the functional properties of the Ca^{2+} uptake, the Ca^{2+} leakage and the Ca^{2+} release channel of the sarcoplasmic reticulum (SR) in skeletal muscle fibers from the suspended hindlimbs of rats. Adult male Wistar rats were obtained and randomly divided into a hindlimb suspension (HS) group and a control group. On the 14th day of HS, animals in both groups were anesthetized and the soleus muscle was immediately removed. In the SR of suspended soleus muscle fibers, the capacity of Ca^{2+} uptake was higher than that in the control muscles. The passive Ca^{2+} leakage from the SR in soleus was apparently increased following HS. Ryanodine treatment reduced the Ca^{2+} uptake capacity of the SR in the control muscle fibers. Following HS, the depression of Ca^{2+} uptake of the SR by the treatment of ryanodine was smaller than that in the control SR. The functional properties of the SR were qualitatively altered during atrophy. These observations suggest that the contractile properties of skeletal muscles may be related to muscular Ca^{2+} movements involved in the SR function.

要 旨

本研究では、筋細胞内 Ca^{2+} を制御する筋小胞体 (SR) の機能を修飾する因子を探ることを目的とし、ラット後肢懸垂モデルを用い萎縮に伴う骨格筋線維の SR における Ca^{2+} 制御機構について検討した。萎縮に伴い SR への Ca^{2+} 取り込みが亢進し、SR からの受動的な Ca^{2+} の漏出が増加した。リアノジンによる SR の Ca^{2+} 取り込みの抑制は、対照筋に比べて萎縮筋の SR では弱かった。このことは、萎縮に伴い SR における Ca^{2+} 制御機構に機能的な変化が生じたことを示すものと考えられた。神経系と筋収縮系の間における情報伝達を担っている SR の機能が萎縮により修飾を受けることから、神経からの情報あるいは筋の活動レベルは筋細胞内 Ca^{2+} の動態を介して、筋の特性を大きく変化させることができるかもしれない。

緒 言

運動の普及により、運動の種類やその活動パターンも多様化している。とくに、各競技団体が徐々にプロ化を目指し、小学生や中学生さらには就学前の子供までが盛んに運動に参加し、将来の一流選手を目指して活動している。トレーニングにより、筋肉を特定の種目特性に適したものに変容させることは、運動指導者にとって重要な課題である。なぜなら、ヒトの運動パフォーマンスは筋肉の性質に大きく左右されると考えられるためである。しかしながら、筋肉の性質は遺伝的因子により強く支配され、トレーニングのような後天的な環境的因子の影響は少ないとされる¹⁹⁾。最近、筋肉の収縮を制御している筋小胞体 (SR) からのカルシウム (Ca^{2+}) 放出機構が次第に明らかになり、SR からの Ca^{2+} 放出を直接制御している2つの蛋白質が見つかった^{6,14,29)}。細胞膜で生じた電気的興奮は、細胞膜が陥没した横行小管 (T管) から SR へと伝達される。SR は T管を両側

から挟むように三つ組み構造 (三連構造, トライアド) を形成している。T管と SR が近接している部分の T管側および SR 側には、それぞれ特定の条件下において Ca^{2+} を選択的に通過させる蛋白質 (Ca^{2+} チャンネル) が存在し、両蛋白質を經由して電気的な変化が SR に伝達されると考えられている²⁷⁾。T管側の Ca^{2+} チャンネルは、ジハイドロピリジン (dihydropyridine: DHP) の受容体であり、SR 終末槽側の Ca^{2+} チャンネルは植物アルカロイドのリアノジン (ryanodine) の受容体である^{6,14,29)}。この2つの受容体蛋白質の機能は、解糖系酵素と密接な関係にあることが明らかにされた²¹⁾。また、SR のもう一つの機能である Ca^{2+} を取り込む能力も解糖系酵素と密接に関連している³⁴⁾。一般に、トレーニングにより筋肉の代謝的特性は大きく修飾されると考えられている。すなわち、トレーニングにより SR の機能を大きく修飾することができる可能性がある。筋肉の収縮特性の差の一部は、SR からの Ca^{2+} の放出と SR への Ca^{2+} の取り込み能により説明できる^{3,21,28,33)} ことから、SR における Ca^{2+} 制御機能が筋の収縮特性を大きく左右する因子であると考えられる。

そこで本研究では、筋細胞内 Ca^{2+} を制御する SR の機能を修飾する因子を探り、筋肉の性質を変えることのできるプログラム開発に対する基礎的資料を提供することを目的とした。

1. 方 法

実験対象動物は、生後12週齢のウィスター系雄性ラットとした。ラットに対して2週間の後肢懸垂を負荷した。ラットの後肢懸垂は、後肢骨格筋における筋肉からの求心性の情報および筋肉の代謝特性が大きく変化することが知られている^{1,2,10,15)}。2週間の懸垂後ラットの両下肢より、遅筋であるひらめ筋を摘出した。対照群としては、同一週齢の通常飼育したラットの同一筋を用いた。筋肉を摘出後、直ちに弛緩液 (20 mM PIPES, 10

mM EGTA, 3.5 mM MgATP, 1.5 mM Mg²⁺, I.S. = 0.2 M, pH 7.0 at 20 °C) 中にて単一筋線維を分離して実験に供した。分離した単一筋線維から機械的に一部の筋鞘を除去したスキンドファイバを作製した。弛緩液が満たされた実験槽の中でファイバーを張力測定用の半導体エレメント (AE801: Aker社製) が装着された装置に接続した。ファイバーを一定のCa²⁺を含む溶液に浸し, SRにCa²⁺を取り込ませた後, カフェイン (35 mM) を作用させた時に生じる時間-張力関係の積分値から, SRに取り込まれたCa²⁺量を推定し, Ca²⁺取り込み能 (Ca²⁺ uptake capacity) として評価 (カフェイン拘縮法^{4,5)}) した。SRへのCa²⁺取り込みは, Ca²⁺濃度をpCa 6.7とした。またリアノジン処理は, 一定濃度 (10 μM) で1分間行った。実験に用いたすべての溶液は, 20 mM PIPES, pH 7.0 (20 °C), イオン強度 (I.S.) = 0.2 Mの条件下で調整した¹³⁾。ひずみ計であるAE801からの張力データは, オシロスコープ (TDS380, ソニー・テクトロニクス社製) にてモニターし, AD216 (日東紡音響エンジニアリング社製) によりパーソナルコンピューター (PC-9821Ap, NEC社製) に接続されたハードディスクにサンプリング周波数12kHzにて直接記録した。測定値の計算は, ハードディスクに記録されたデータを用いて行った。すべての実験は, 20 ± 1 °Cにて行った。

得られたすべてのデータは, 平均値±標準偏差 (SD) で示した。また, 各群間における統計学的有意差の検定は, Student's *t*-testにて行い, 危険率5%以下を以って有意とした。

2. 結果

2.1 SRへのCa²⁺の取り込み

図1にSRに取り込まれたCa²⁺の経時変化について, 120秒間Ca²⁺を取り込ませた時にSR内のCa²⁺量を基準に, 30および60秒の取り込み時

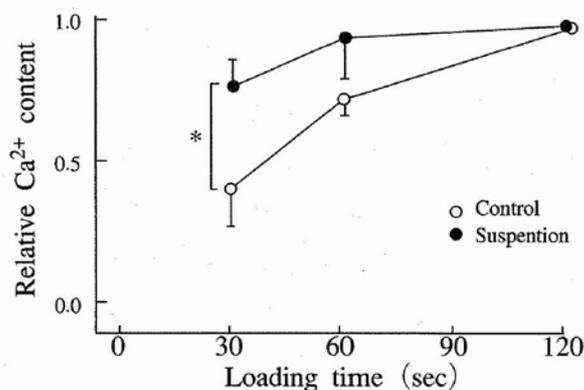


図1 Relative Ca²⁺ contents in the sarcoplasmic reticulum (SR) in partially skinned fibers from control and 2-week tail suspended rats.

Value are normalized to that at 120 s of Ca²⁺-loading time.

*: Significant difference between control and suspended muscle fiber, *p*<0.05.

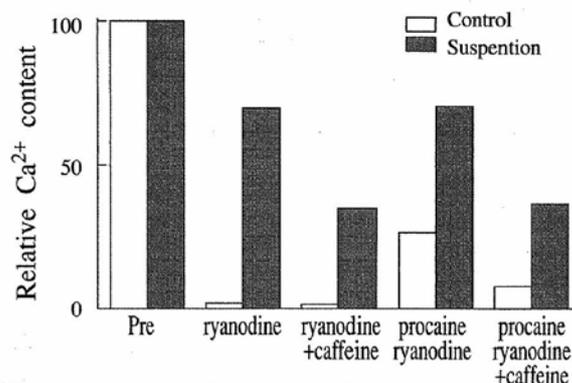


図2 Relative Ca²⁺ contents in the sarcoplasmic reticulum (SR) in partially skinned soleus fibers from control and 2-week tail suspended (Suspension) rats.

Values are normalized to that at Pre condition in control and suspended rats.

Pre: untreated partially skinned fibers, ryanodine: ryanodine (10 μM) treatment for 1 min before the loading of Ca²⁺, ryanodine+caffeine: ryanodine (10 μM) treatment with 25 mM caffeine for 1 min before the loading of Ca²⁺, procaine ryanodine: Ca²⁺ loading in the presence of 10 mM procaine after the ryanodine treatment (10 μM for 1 min), procaine ryanodine+caffeine: Ca²⁺ loading in the presence of 10 mM procaine after the ryanodine treatment (10 μM) with caffeine (25 mM) for 1 min.

間におけるSR内のCa²⁺量を相対値で示した。懸垂群では対照群に比べてSRへの速いCa²⁺取り込みが認められた。

2.2 SRからの受動的なCa²⁺の漏出

SRに120秒間Ca²⁺を取り込ませた後, 120秒間に生じるSRからのCa²⁺の漏出により, SRに残存したCa²⁺量は対照群でCa²⁺取り込み直後の

29.3 ± 10.8 % (n = 6), 懸垂群では3.5 ± 2.4 % (n = 7) と懸垂群が有意に低い値を示した (p<0.01).

2. 3 Ca²⁺放出チャンネルに対するリアノジンの影響

各処理条件下におけるSR内に取り込まれたCa²⁺の量を図2に示した。SRへのCa²⁺取り込み時間は、すべての条件において60秒間とした。対照群、懸垂群ともに、各種処理前の値 (Pre) を100%として、各処理による変化を相対値で表わした。対照群に対してリアノジン処理を施すと、SRのCa²⁺取り込みが著しく抑制された。このリアノジン処理によるSRへのCa²⁺取り込みの抑制効果は、SRにCa²⁺を取り込ませる時にプロカイン (10 mM) を共存させることで取り込みの改善が認められた。SRのCa²⁺取り込み能に対するリアノジンの抑制効果は、リアノジン処理時にカフェイン (25 mM) を共存させることで増強した。懸垂群では、リアノジンのSRのCa²⁺取り込みに対する抑制効果は、対照群に比べ減少した。SRへのCa²⁺取り込みに対して、プロカイン効果は認められなかった。カフェインによりリアノジンのCa²⁺取り込みに対する抑制効果は増強した。

3. 考 察

ラットの後肢懸垂は、後肢骨格筋が無負荷状態になり、ひらめ筋に代表される姿勢維持筋などに顕著な萎縮が生じることはよく知られている^{1,11,35}。後肢懸垂により萎縮したひらめ筋では、収縮特性や代謝特性にも大きな機能的変化が認められる^{8,11,25,26}。このような萎縮に伴い、ひらめ筋では興奮収縮連関に密接に関与するSRにも、機能的な変容が生じることが報告されている^{30,32,36,37}。筋細胞膜からSRへの情報伝達の経路であると考えられている骨格筋の三連構造²⁷には、萎縮に伴い形態的变化は生じないことが報告されている³⁸。本研究では、萎縮筋における筋

原形質からSR内部へのCa²⁺の取り込み能の亢進が認められた。これは、SR内部へCa²⁺を取り込んでいる蛋白が、萎縮に伴い遅筋型からより取り込み能が優れた速筋型への移行あるいは蛋白自体の密度の増加によると考えられる^{7,30}。このようなSR蛋白の遅筋型から速筋型への移行は、除神経によっても引き起こされる³¹ことから、SRの蛋白質の発現は、神経系の支配を強く受けていることを示唆するものと考えられる^{12,20}。

萎縮に伴いひらめ筋の収縮蛋白質や代謝に関連ある酵素蛋白質の分布なども、遅筋タイプから速筋タイプへ変容する^{1,2,8,11}。このことは、代謝関連酵素と機能的に関連している²¹リアノジン受容体蛋白質も萎縮に伴い何らかの変化を生じている可能性を強く示唆する。本研究では、SRのCa²⁺取り込み機能に対するリアノジンの抑制が萎縮筋では対照筋に比して弱いものであった。また、開口したCa²⁺チャンネルを可逆的にブロックするプロカイン^{9,24}は、対照筋におけるリアノジンにより抑制されたSRのCa²⁺取り込み能を回復させたが、萎縮筋におけるプロカインの効果は対照筋に比べて小さかった。これらの結果は、リアノジンが結合して開口した状態のチャンネルが減少したことを示す。しかし、萎縮筋のSRにおけるリアノジン受容体の数について、ポリクローナル抗体を用いた報告によれば、むしろその数は増えるとしている¹⁷。抗体を用いた場合、遅筋型のリアノジン受容体蛋白質の物理的な量を評価していることになる。一方、我々が用いたカフェイン拘縮法では、リアノジン受容体を含めたSRの機能を評価していることになる。さらにSRのCa²⁺チャンネルには、速筋型と遅筋型があり^{18,22,28}、両者ではリアノジンに対する親和性が異なるなど³³、Ca²⁺チャンネルのタイプ変換が生じた可能性も考えられる。したがって、両者の結果を相反するものと捉えることはできない。萎縮筋SRにおけるCa²⁺チャンネルの構造について、今後より詳細な検

討が必要と考えられた。

萎縮に伴いひらめ筋SRのCa²⁺チャネルのCa²⁺によるCa²⁺遊離(CICR)が増強することが報告されている^{32,39)}。本研究では、リアノジンにより抑制されたSRにおけるプロカインによるCa²⁺取り込みの亢進は、対照筋SRに比べて萎縮筋では弱いものであった。もし、萎縮筋においてCICRが亢進しているならば、プロカインによりCICRが抑制され、Ca²⁺取り込み能はより増大すると考えられる。しかし、萎縮筋SRでは、SRからのCa²⁺の漏出が多い^{32,39)}。CICRが抑制されているにもかかわらず、SRからCa²⁺の漏出量が対照筋SRに比べて多いことが十分に考えられる。萎縮に伴うT管やSRのCa²⁺チャネルの機能的変化に関する報告は少なく^{16,17,37)}、今後の研究が望まれる。

4. まとめ

本研究ではラット後肢懸垂モデルを用いて、萎縮に伴う骨格筋線維のSRにおけるCa²⁺制御機構について検討した。萎縮に伴いSRへのCa²⁺取り込みが亢進し、SRからの受動的なCa²⁺の漏出が増加した。リアノジンによるSRのCa²⁺取り込み能の抑制効果は、萎縮筋のSRでは弱かった。このことは、萎縮に伴いSRにおけるCa²⁺制御機構に機能的な変化が生じたことを示すものと考えられた。神経系と筋収縮系の間における情報伝達を担っているSRの機能が萎縮により修飾を受けることから、神経からの情報あるいは筋の活動レベルを大きく変化させることで、筋の特性を大きく変化させることができるかもしれない。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に対して助成をいただいた財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に感謝いたします。

文 献

- 1) Baldwin, K.M ; Effects of altered loading states on muscle plasticity : what have we learned from rodents?, *Med. Sci. Sports Exerc.*, 28, S101-S106 (1996)
- 2) Campione, M., Ausoni, S., Guezennec, C.Y. and Schiaffino, S. ; Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension, *J. Appl. Physiol.*, 74, 1156-1160 (1993)
- 3) Delbono, O. and Meissner, G. S. ; Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat slow- and fast-twitch muscles, *J. Membrane Biol.*, 151, 123-130 (1996)
- 4) Endo, M. ; Calcium release from the sarcoplasmic reticulum, *Physiol. Rev.*, 57, 71-108 (1977)
- 5) Endo, M. and Iino, M. ; Measurement of Ca²⁺ release in skinned fibers from skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, 157, 12-26 (1988)
- 6) Fleischer, S., Ogunbunmi, E.M., Dixon, M.C. and Fleer, E.A.M. ; Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7256-7259 (1985)
- 7) Ferguson, D. G. and Franzini-Armstrong, C. ; The Ca²⁺ ATPase content of slow and fast twitch fibers of guinea pig, *Muscle Nerve*, 11, 561-570 (1988)
- 8) Fitts, R.H., Brimmer, C.J., Heywood-Cooksey, A. and Timmerman, R.J. ; Single muscle fibers enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization, *Am. J. Physiol.*, 256 (Cell Physiol., 25), C1082-C1091 (1989)
- 9) Ford, L.E. and Podolsky, R.J. ; Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions, *J. Physiol.*, 223, 1-23 (1972)
- 10) 藤谷博人 ; 除神経を加えた懸垂後肢骨格筋の形態および生化学的検索, *宇宙航空環境医学*, 29, 95-105 (1992)
- 11) Gardetto, P. R., Schluter, J. M. and Fitts, R. H. ; Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension, *J. Appl. Physiol.*, 66, 2739-2749 (1989)
- 12) Heiner, L., Domonkos, J., Motika, D. and Vargha, M. Jr. ; Role of the nervous system in regulation of the sarcoplasmic membrane function in different muscle fibres, *Acta Physiol. Hung.*, 64, 129-133 (1984)
- 13) Horiuchi, K. ; Some properties of the contractile system and sarcoplasmic membrane function in different muscle fibres, *J. Physiol.*, 373, 1-23 (1986)
- 14) Inui, M., Saito, A. and Fleischer, S. ; Purification of

- the ryanodine receptor and identity with feet structure of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, 262, 1740-1747 (1987)
- 15) 石原昭彦, 大平充宣; 低圧および無重量への暴露による筋・神経系の反応. 宇宙航空環境医学, 33, 177-185 (1996)
 - 16) Kandrian, S.C., O'Brien, S., Thomas, K., Schulte, L. and Navarro, J.; Regulation of skeletal muscle dihydropyridine receptor gene expression by biomechanical unloading, *J. Appl. Physiol.*, 72, 2510-2514 (1992)
 - 17) Kandarian, S.C., Peters, D.G., Favero, T.G., Ward, C.W. and Williams, J.H.; Adaptation of skeletal muscle calcium-release mechanism to weight-bearing condition, *Am. J. Physiol.*, 270 (Cell Physiol., 39), C1588-C1594 (1996)
 - 18) Kim, D. H., Ohnishi, S. T. and Ikemoto, N.; Kinetic studies of calcium release from sarcoplasmic reticulum in vitro, *J. Biol. Chem.*, 258, 9662-9668 (1983)
 - 19) Komi, P. V., Viitasalo, J. H. T., Vavu, M., Thorstensson, A., Sjodin, B. and Karlsson, J.; Skeletal muscle fibres and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes, *Acta Scand. Physiol.*, 100, 385-392 (1977)
 - 20) Leberer, E., Seedorf, U. and Pette, D.; Neural control of gene expression in skeletal muscle. Calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles, *Biochem. J.*, 239, 295-300 (1986)
 - 21) Lee, Y. S., Ondrias, K., Duhl, A. J., Ehrlich, B. E. and Kim, D. H.; Comparison of calcium release from sarcoplasmic reticulum of slow and fast twitch muscles, *J. Membrane Biol.*, 122, 155-163 (1991)
 - 22) Meissner, G.; Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 261, 6300-6306 (1986)
 - 23) Meltzer, W., Herrmann-Frank, A. and Lüttgan, H. Ch.; The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres, *Biochim. Biophys. Acta*, 1241, 59-116 (1995)
 - 24) Oyamada, H., Iino, M. and Endo, M.; Effects of ryanodine on the properties of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibres of the frog, *J. Physiol.*, 470, 335-348 (1993)
 - 25) Patterson, G. T. and Dettbarn, W. D.; Changes in skeletal muscle properties following hindlimb suspension, *Physiologist*, 28, S133-S134 (1985)
 - 26) Reiser, P. J., Kasper, C. E. and Moss, R. L.; Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscles, *J. Appl. Physiol.*, 63, 2293-2300 (1987)
 - 27) Ríos, E., Pizarro, G. and Stefani, E.; Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling, *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 109-133 (1992)
 - 28) Salviati, G. and Volpe, P.; Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skinned fast- and slow-twitch muscle fibers, *Am. J. Physiol.*, 254, C459-C465 (1988)
 - 29) Sanchez, J.A. and Stefani, E.; Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog, *J. Physiol.*, 283, 197-209 (1978)
 - 30) Schulte, L., Navarro, J. and Kandrian, S.C.; Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium pump gene expression by hindlimb unweighting, *Am. J. Physiol.*, 264 (Cell Physiol., 33), C1308-C1315 (1993)
 - 31) Schulte, L., Peters, D., Taylor, J., Navarro, J. and Kandrian, S.C.; Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump expression in denervated skeletal muscle, *Am. J. Physiol.*, 267 (Cell Physiol., 36), C617-C622 (1993)
 - 32) Stevens, L. and Mounier, Y.; Ca²⁺ movements in sarcoplasmic reticulum of rat soleus fibers after hindlimb suspension, *J. Appl. Physiol.*, 72, 1735-1740 (1992)
 - 33) Su, J.Y. and Chang, Y.I.; Modulation of the ryanodine receptor sarcoplasmic reticular Ca²⁺ channel in skinned fibres of fast- and slow-twitch skeletal muscles from rabbits, *Pflügers Arch.*, 430, 358-364 (1995)
 - 34) Xu, K. Y., Zweier, J. L. and Becker, L. C.; Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport, *Circ. Res.*, 77, 88-97 (1995)
 - 35) 山下勝正, 吉岡利忠; ラット廃用性萎縮筋線維の短縮速度とカルシウム感受性, 宇宙航空環境医学, 30, 71-80 (1993)
 - 36) Yamashita-Goto, K. & Yoshioka, T.; Functional properties of sarcoplasmic reticulum in rat hindlimb muscles exposed to a simulated weightless environment, *Proc. 46th Intl Astronaut. Congr.*, 1-4 (1995)
 - 37) 吉岡利忠, 山下勝正; 懸垂下肢骨格筋の筋小胞体機能について. 運動生化学, 8, 55-56, 1996.
 - 38) 吉岡利忠, 山下勝正; 懸垂萎縮骨格筋の三連構造

- における機能的構造的適応. 宇宙航空環境医学, 33, 187-195 (1995)
- 39) Yoshioka, T., Shirota, T., Tazoe, T. and Yamashita-Goto, K. ; Calcium movement of sarcoplasmic reticulum from hindlimb suspended muscle, *Acta Astronautica*, 38, 209-212 (1996)