

〔原著〕

低頻度疲労に伴う筋原線維 Ca^{2+} 感受性の変化渡 邊 大 輝*
和 田 正 信*Changes in myofibrillar Ca^{2+} sensitivity with low-frequency fatigue

Daiki WATANABE

(Graduate School of Integrate Arts and Sciences, Hiroshima University)

Masanobu WADA

(Graduate School of Integrate Arts and Sciences, Hiroshima University)

Abstract

Low-frequency fatigue (LFF) is characterized by reduced tetanic force at low frequency stimulation while tetanic force at high frequency stimulation is close to normal. The purpose of this study was to examine changes in myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in rat fast-twitch muscle fibers with LFF. Intact rat gastrocnemius muscles (GAS) were electrically stimulated (fatiguing stimulation: 70 Hz, 0.35-s train, every 3 s) via the sciatic nerve until force was reduced to 50% of initial. Tetanic force in intact GAS induced through various frequencies of stimulation was measured 30 min after the end of fatiguing stimulation. A loss of tetanic force was significantly greater with low frequency stimulation than with high frequency stimulation (a $36.5 \pm 8.9\%$ decrease at 20 Hz vs. a $14.3 \pm 4.7\%$ decrease at 100 Hz). After the measurement, mechanically skinned fibers were prepared from the superficial region of GAS. Skinned fibers were directly activated in heavily buffered Ca^{2+} solutions to assess myofibrillar Ca^{2+} sensitivity. Fatiguing stimulation did not bring about changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$, a Ca^{2+} concentration at half-maximum force ($1.04 \pm 0.06 \mu\text{M}$ for control vs. $0.99 \pm 0.07 \mu\text{M}$ for stimulation). When skinned fibers were subjected to S-glutathionylation by successive treatments with 2,2'-dithiodipyridine and glutathione, $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ was changed to a greater extent in unfatigued fibers than in fatigued fibers. These findings suggest that decreases in myofibrillar Ca^{2+} sensitivity are not responsible for LFF at least in an *in situ* fatigue model and that S-glutathionylation that occurs during muscle contractions would offset the depressive effect of contraction to fatigue on the Ca^{2+} sensitivity.

Key words: S-glutathionylation, muscle fatigue, glutathione, skinned fiber

* 広島大学大学院総合科学研究科

I. 緒言

筋疲労とは、最大張力の低下もしくは一定の張力を維持できなくなる現象と定義される。筋疲労に関する多くの研究では、電気刺激を用いて筋の収縮を誘起し、得られた値から筋疲労の程度が評価されてきた。この方法を用いると、与える電気刺激の頻度が高まるにつれ張力は増加し、ヒトの場合、刺激頻度が50 Hz前後で張力は最大となる（ここでは、ほぼ最大張力が得られる刺激を高頻度刺激、最大値に対して約60%以下の張力が得られる刺激頻度を低頻度刺激と呼ぶことにする）。Edwards et al. (1977) は、運動後の回復期において、高頻度刺激によって発揮される張力よりも低頻度刺激によって発揮される張力の方が大きく低下し、その状態は長時間持続することを報告した。以後、この現象は低頻度疲労 (low-frequency fatigue: LFF) と呼ばれるようになった。LFFは、神経を除去した筋でも発生することから (Chin and Allen 1996, Westerblad et al. 1993)、神経系の変化ではなく、筋細胞における興奮収縮連関の機能低下によって生ずると考えられている。

ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを主成分とする筋原線維は、興奮収縮連関において主要な役割を担う器官である。Bruton et al. (2008) は、収縮を繰り返したラットの速筋線維では、筋原線維のCa²⁺感受性が低下することを示し、この変化がLFFの原因の1つであることを示唆している。しかしながら、この研究では単離した単一筋線維が用いられており、生体内で同様の現象が生じるか否かは不明である。

活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) とは、通常のものより反応性の高い酸素化合物を指し、筋収縮とともにその産生量が高まる。この化合物が、細胞内小器官を修飾することが、筋疲労の原因の1つであると考えられている。例えば、Moopanar and Allen (2005) は、ROSの除去剤の添加によって筋疲労が軽減されたことを報告し

ている。しかしながら、ROSは筋の機能に対してマイナスに作用するばかりではなく、条件によってはプラスに働きかけることもある (Dalle-Donne et al. 2007)。その現象の1つが、スルフヒドリル基と還元型グルタチオンが、ジスルフィド結合を形成する反応であるS-glutathionylationが生じたときにみられる。近年、速筋線維に含まれるトロポニンIにS-glutathionylationが発生すると、筋原線維のCa²⁺感受性が増加することが報告されており (Mollica et al. 2012)、筋収縮時に生体内においても、S-glutathionylationに起因する変化が起こることが推察されるが、この点についての報告はなされていない。これらのことから本研究では、生体内で収縮させた筋を対象とし、1) LFF発生時に、筋原線維のCa²⁺感受性が変化するか否か、2) 変化するとすれば、S-glutathionylationがそれに関与しているか否かを検討することを目的とした。

II. 実験方法

1. 実験動物および実験プロトコール

本研究の実験プロトコールは、広島大学動物実験委員会で認められたものである。実験には9週齢のWistar系雄性ラット9匹を用いた。電気刺激は、Mishima et al. (2008)の方法に基づいて行った。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下にて、ラットを仰臥位に置き、足部をフットホルダーに固定した。右脚の坐骨神経に電極を取り付け、電気刺激装置 (日本光電社製、SEN-7230) を用い、電気刺激を腓腹筋 (gastrocnemius: GAS) に与え、筋収縮を誘起した。発揮張力は、フットホルダーに接続した張力計 (日本光電社製、TB-611T) を用いて記録した。

種々の刺激頻度 (1, 20, 40, 60, 80, 100 Hz) で張力を測定した後、筋疲労を誘起するために連続電気刺激 (疲労刺激; 70 Hz, 0.35-s train, every 3 s) を張力が初期値の50%に至るまで与えた。疲労刺激終了後、30分の安静期間を置き、疲労刺激前と同様の方法で各刺激頻度での張力を測定した。右脚を疲労刺激 (stimulated: Stim) 群、

刺激を与えていない左脚をコントロール (control: Con) 群とし、張力測定後両脚から GAS を摘出した。

2. スキンドファイバーの作製

摘出した GAS の表層部から, Brotolotto et al. (1999) の方法に基づき, スキンドファイバーを作製した。顕微鏡下で, ピンセットを用い単一筋線維を単離し, 筋形質膜を剥離した。その後, 筋線維長が安静時の約 1.2 倍になるように張力計 (Scientific Instruments 社製, SI-MKB-OXY) に取り付けた。これらの作業は, すべてパラフィンオイル内で行った。

3. 筋原線維の Ca²⁺ 感受性

筋原線維の Ca²⁺ 感受性は, Molica et al. (2012) の方法に基づいて測定した。スキンドファイバーを Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]) が異なる溶液 (10^{-9.0}, 10^{-6.4}, 10^{-6.2}, 10^{-6.0}, 10^{-5.8}, 10^{-5.6}, 10^{-5.4}, 10^{-4.7} M) に曝露し, 張力を測定した。測定 (measurement) 溶液中の [Ca²⁺] は, 弛緩 (relaxation) 溶液 (<10⁻¹⁰ M) と最大 Ca²⁺ (maxCa) 溶液 (10^{-4.7} M) とを種々の割合で混合することによって調整した。Hill の式に基づき, 張力-[Ca²⁺] 曲線の近似式を算出した。近似式から, 最大張力の 50% が得られる [Ca²⁺] ([Ca²⁺]₅₀) を算出し, Ca²⁺ 感受性を評価した。この評価法では, [Ca²⁺]₅₀ が高いほど Ca²⁺ 感受性が低いことを表す。Table 1 に, 用いた溶液の組成を示した。

4. S-glutathionylation の影響

S-glutathionylation が Ca²⁺ 感受性に及ぼす影響は, Molica et al. (2012) の方法に基づいて測定した。筋原線維の Ca²⁺ 感受性を測定した後, スキンドファイバーを 100 μM の 2,2'-ジチオジピリジン (2,2'-dithiodipyridine: DTDP) を含む溶液に 5 分間, 続いて 5 mM の還元型グルタチオン (reduced glutathione: GSH) を含む溶液に 2 分間曝露した (DTDP-GSH 処置)。その後, 筋原線維の Ca²⁺ 感受性を再び測定した。DTDP-GSH 処置前の [Ca²⁺]₅₀ と処置後の [Ca²⁺]₅₀ の差 (Δ[Ca²⁺]₅₀) を S-glutathionylation の発生量として評価した。この評価法では, Δ[Ca²⁺]₅₀ が小さいほど, DTDP-GSH 処置前に S-glutathionylation が多く発生していたことになる。DTDP-GSH 処理で用いた溶液は, 100 mM DTDP (100% エタノールに溶解) および 100 mM GSH (K-HDTA 溶液に溶解) をストックしておき, それらを上記の濃度になるよう弛緩溶液で希釈することによって作製した。なお, スキンドファイバーを用いた測定は室温 (25°C) で行った。

5. 統計処理

統計量は, 平均値 ± 標準偏差で示した。各刺激頻度間での発揮張力の差異の検定には, 一元配置の分散分析を用いた。有意な F 値が得られた場合は, Holm-Sidak の方法に従って統計学的有意性を検定した。スキンドファイバーを用いた実験における Con 群と Stim 群間の差異の検定には, 対応のない t 検定を用いた。なお, 有意水準は 5 %

Table 1. Composition of solutions used to determine myofibrillar Ca²⁺ sensitivity.

All solutions contained (mM): Na⁺, 36; K⁺, 126; HEPES, 90; ATP_{total}, 8; creatine phosphate, 10. The pH of all solutions was 7.10.

solutions	Mg ²⁺ _{free} (mM)	EGTA _{total} (mM)	HDTA _{total} (mM)	[Ca ²⁺] _{free} (M)
K-HDTA	1	-	50	10 ^{-7.1}
MaxCa	1	50	-	10 ^{-4.7}
Relaxation	1	50	-	<10 ⁻¹⁰
Measurement	1	50	-	10 ^{-9.0} -10 ^{-4.7}

未満とした。

Ⅲ. 実験結果

1. 全筋の発揮張力

Fig. 1A に疲労刺激中の張力変化の一例を、Fig. 1B に疲労刺激終了30分後における張力を疲労刺激前の値に対する割合で示した。疲労刺激において、張力が初期値の50%に低下するのに要した時間は 266 ± 36 秒であった。疲労刺激終了後における疲労刺激前に対する張力の割合は、1 Hz で $62.4 \pm 8.9\%$ 、20 Hz で $63.5 \pm 9.4\%$ 、40 Hz

で $77.5 \pm 6.7\%$ 、60 Hz で $85.5 \pm 5.8\%$ 、80 Hz で $87.3 \pm 3.5\%$ 、100 Hz で $85.7 \pm 4.7\%$ であった。60 Hz、80 Hz および 100 Hz の張力は、1 Hz、20 Hz および 40 Hz に対して有意な高値を示した。

2. 筋原線維の Ca^{2+} 感受性および S-glutathionylation が筋原線維の Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響

Fig. 2A に張力- $[\text{Ca}^{2+}]$ 曲線を、Fig. 2B に $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ を示した。 $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ は、Stim 群で $0.99 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 、Con 群で $1.04 \pm 0.06 \mu\text{M}$ であり、両群間に有意な

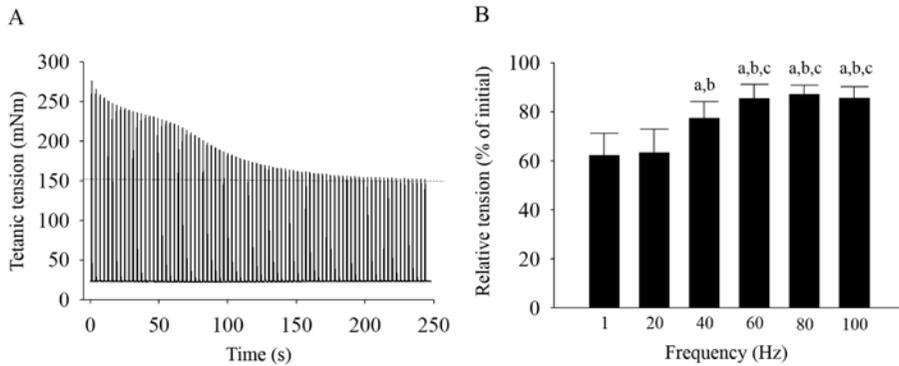


Fig. 1. Effects of stimulation on the tension in the intact gastrocnemius muscles.

A: Time course changes in tetanic tension with fatiguing stimulation (70Hz, 0.35-s train, every 3 s). The dash line represents 50 % of initial tetanic tension. Data is from one sample. B: Ratio of tension after stimulation to that before stimulation. Values are means \pm SD (n=9). ^a $P < 0.05$, vs 1 Hz, ^b $P < 0.05$, vs 20 Hz, ^c $P < 0.05$, vs 40 Hz.

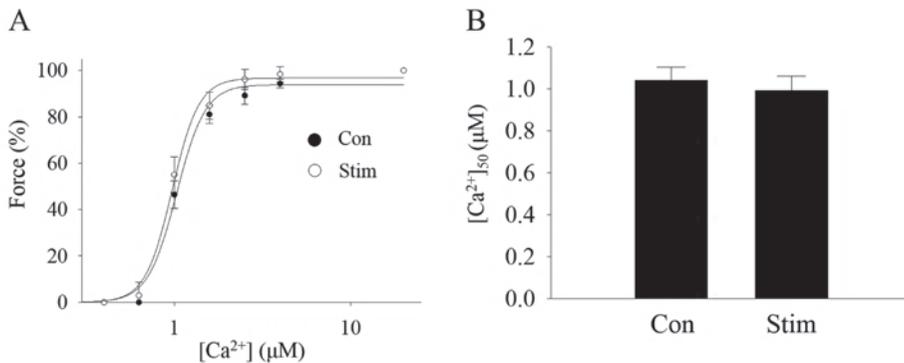


Fig. 2. Effects of stimulation on myofibrillar Ca^{2+} sensitivity.

A: Hill fits to force- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) data. $[\text{Ca}^{2+}]$ is expressed as \log_{10} scale. Open circles, Stim; filled circles, Con. B: $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ values. $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$, a concentration at half-maximum force. Values are means \pm SD (n=6).

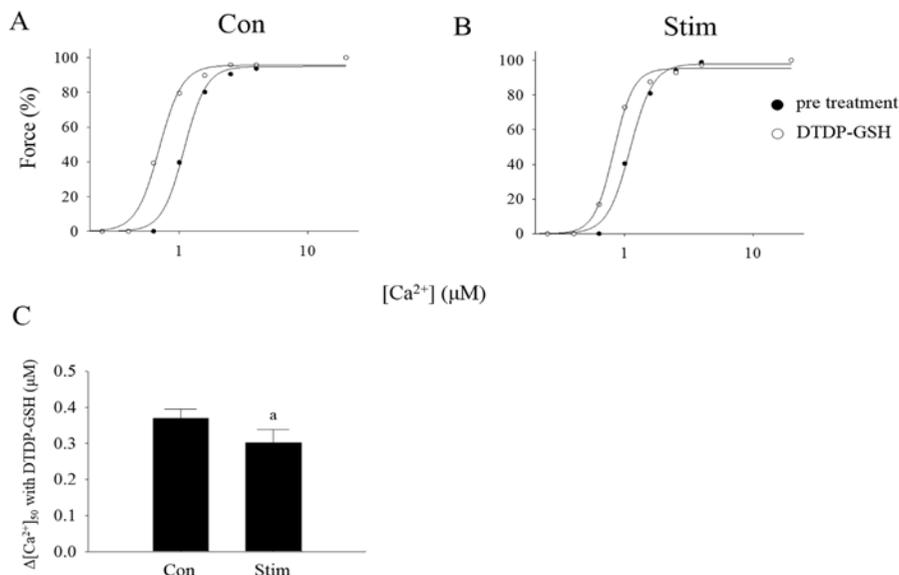


Fig. 3. Effects of DTDP-GSH treatment on myofibrillar Ca^{2+} sensitivity.

A and B: Hill fits for force- $[\text{Ca}^{2+}]$ data before (filled circles) and after (open circles) DTDP-GSH treatment in Con (A) and Stim (B). $[\text{Ca}^{2+}]$ is expressed as log₁₀ scale. C: DTDP-GSH treatment-induced change in $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$. Values are means \pm SD (n=6). ^a $P < 0.05$, vs Con.

差異はみられなかった。Fig. 3A に Con 群, Fig. 3B に Stim 群における DTDP-GSH 処置前後の張力- $[\text{Ca}^{2+}]$ 曲線を, また, Fig. 3C に両群の $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ を示した。 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ は, Stim 群で $0.302 \pm 0.04 \mu\text{M}$, Con 群で $0.369 \pm 0.03 \mu\text{M}$ であり, Con 群に対して Stim 群では有意な低値を示した。なお, 腓腹筋には速筋線維だけではなく, 少量ではあるが遅筋線維が存在する。遅筋線維の測定結果を除いたため, 使用したラット数9匹に対して, この実験でのサンプル数は6となった。

IV. 考 察

本研究で用いた疲労刺激では, 疲労刺激後の張力の評価において, 張力発揮を誘起する電気刺激の頻度が低いほど, 刺激前と比較して張力が大きく低下することが認められ (Fig. 1), 本実験モデルで LFF が生じたことが確認された。これまで, LFF が起こる原因としては, 筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量の低下あるいは筋原線維の Ca^{2+} 感受性の低下が示唆されてきた (Westerblad et al. 1993, Molica et al. 2012)。しかしながらこれらの

知見は, 単離した無傷の単一筋線維 (インタクトファイバー) を対象に, 試験管内で収縮を負荷するかあるいは薬理的な処置を施すかしたものであり, 生体内でこのような現象 (Ca^{2+} 放出量あるいは Ca^{2+} 感受性の低下) が起こっているかの否かについては不明であった。そこで本研究では, 生体内で収縮させた筋を用い, LFF に伴う Ca^{2+} 感受性の変化について検討したところ, インタクトファイバーで得られた知見とは異なり, Ca^{2+} 感受性は変化しないことが観察された (Fig. 2)。

近年, 速筋線維に発現しているトロポニン I の 133 番目のシステイン残基に S-glutathionylation が発生すると, トロポニン I の構造が変化し, 筋原線維の Ca^{2+} 感受性が亢進することが報告されている (Molica et al. 2012)。本研究において, S-glutathionylation が Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響を分析したところ, DTDP-GSH 処置による Ca^{2+} 感受性の変化の程度 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$) は, Con 群と比べ Stim 群の方が小さいことが観察された (Fig. 3)。この知見は, Con 群と比較して Stim 群では, DTDP-GSH 処置前に S-glutathionylation が多く

のトロポニンIで発生していること、また、Stim群でCa²⁺感受性が変化しなかったのは、「何らかの要因」によるCa²⁺感受性の低下とS-glutathionylationによる感受性の亢進が拮抗した結果であること示唆するものである。

Andrade et al.(1999)は、インタクトファイバーを100 μMの過酸化水素を含む溶液に曝露すると、筋原線維のCa²⁺感受性が低下することを観察しており、感受性の低下を招来する「何らかの要因」としては、過酸化水素の作用があげられる。同じくインタクトファイバーを用い、スーパーオキシドジスムターゼ活性の高いラット骨格筋では、LFFに伴い筋原線維のCa²⁺感受性の低下が生じるが、活性の低いマウスでは感受性は変化しないことを示すBruton et al. (2008)の報告は、これを支持するものである。これに対して、スキンドファイバーを用いた研究では、過酸化水素によって、感受性は変化しないことが観察されている。Murphy et al. (2008)は、過酸化水素とミオグロビンを含む溶液に、スキンドファイバーを浸漬すると感受性が低下することを観察し、インタクトファイバーでは、過酸化水素とミオグロビンに含まれるFe²⁺との反応(フェントン反応)により、ヒドロキシルラジカルが産生され、このROSが感受性の低下を誘起したのでであろうと推察している。

インタクトファイバーではCa²⁺感受性の低下が生ずるが(Bruton et al. 2008)、生体内で収縮を行わせた線維では、同様の現象が起こらない成因としては、後者と比べ前者(インタクトファイバー)では、1) S-glutathionylationが発生しにくいこと、あるいは2) ROSの影響によるCa²⁺感受性低下の程度が大きいことが考えられる。S-glutathionylation発生に必須であるグルタチオンは膜透過性が低く、インタクトファイバーにおいて、グルタチオンが細胞外部へ流出し、1)のような条件が形成されたとは考えにくい。2)の条件が形成される理由については、過酸化水素の膜透過性が比較的高いことを考慮すると、血流がある生体内の筋線維と比べインタクトファイバー

では、拡散による過酸化水素の細胞外への流出が生じにくいことが推察される。

ここまで述べてきたように、本研究では、筋原線維のCa²⁺感受性の低下がLFFの成因ではないことを示唆する結果が得られた。したがって、前述のもう1つの要因すなわち筋小胞体からのCa²⁺放出量の低下が、LFFを招来していると考えられる(Westerblad et al. 1993)。今後、Ca²⁺放出量の低下が生体内でも生じているか否か、生じているとすればどのようなメカニズムが関与しているのかなどについて明らかにする必要がある。また、本研究で用いた実験モデルでは、生体内で行ったとはいえ、麻酔下にて電気刺激によって収縮させる手法を用いており、筋細胞が置かれた環境が、生体内のものと同様であったとは言いがたい。今後、ランニングなどの日常行われる運動における変化も検討すべきであろう。

本研究では、生体内で収縮させた筋を対象とし、LFFに筋原線維のCa²⁺感受性の低下が関与しているか否かを、スキンドファイバーを用いて検討した。得られた結果から、1) 筋原線維のCa²⁺感受性の低下がLFFの成因ではないこと、2) S-glutathionylationの発生がCa²⁺感受性の低下を抑制していることが示唆された。

V. 総括

本研究の目的は、生体内で収縮させた筋を対象とし、1) 低頻度疲労(LFF)発生時に、筋原線維のCa²⁺感受性が変化するか否か、2) 変化するとすれば、S-glutathionylationがそれに関与しているか否かを検討することであった。9週齢のWistar系雄性ラットを用い、右脚(Stim群)に電気刺激による疲労刺激を負荷し、刺激終了30分後に腓腹筋を摘出した。左脚はコントロール(Con)群として用いた。また、疲労刺激前後に腓腹筋の張力を種々の刺激頻度で測定した。摘出した腓腹筋からスキンドファイバーを作製し、疲労刺激およびS-glutathionylationが筋原線維のCa²⁺感受性に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

1. 疲労刺激において、腓腹筋の張力が初期値の 50% に低下するのに要した時間は、 266 ± 36 秒であった。
2. 疲労刺激終了 30 分後では、張力発揮を誘起する電気刺激の頻度が低いほど、刺激前と比較して張力が大きく低下することが認められた。
3. $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ (最大張力の 50% が得られる $[\text{Ca}^{2+}]$) は、Stim 群と Con 群とで差異は認められなかった。
4. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ (DTDP-GSH 処置前の $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ と処置後の $[\text{Ca}^{2+}]_{50}$ の差) は、Con 群と比べ Stim 群の方が小さかった。

以上の結果から、1) 筋原線維の Ca^{2+} 感受性の低下が LFF の成因ではないこと、2) S-glutathionylation の発生が Ca^{2+} 感受性の低下を抑制していることが示唆された。

文献

- Allen, D. G., Clugston, E., Petersen, Y., Roder, I. V., Chapman, B. and Rudolf, R. (2011). Interactions between intracellular calcium and phosphate in intact mouse muscle during fatigue. *J. Appl. Physiol.*, 111: 358-366.
- Andrade, F. H., Reid, M. B., Allen D. G. and Westerblad, H. (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.*, 509: 565-575.
- Bortolotto, S. K., Stephenson, D. G. and Stephenson, G. M. (1999). Fiber type populations and Ca^{2+} -activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. *Am. J. Physiol.*, 276: C628-C637.
- Bruton, J. D., Place N., Yamada, T., Silva, J. P., Andrade, F. H., Dahlstedt, A. J., Zhang, S.-J., Katz, A., Larsson, N.-G. and Westerblad, H. (2008). Reactive oxygen species and fatigue-induced prolonged low-frequency force depression in skeletal muscle fibres of rats, mice and SOD2 overexpressing mice. *J. Physiol.*, 586: 175-184.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R. and Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.*, 43: 883-898.
- Edwards, R. H. T., Hill, D. K., Jones, D. A. and Merton, P. A. (1977). Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J. Physiol.*, 272: 769-778.
- 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. *Eur. J. Physiol.*, 456: 601-609.
- Mollica, J. P., Dutka, T. L., Merry, T. L., Lambole, C. R., McConell, G. K., McKenna, M. J., Murphy, R. M. and Lamb, G. D. (2012). S-glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans. *J. Physiol.*, 590: 1443-1463.
- Moopanar, T. R. and Allen, D. G. (2005). Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J. Physiol.*, 564: 189-199.
- Murphy, R. M., Dutka, T. L. and Lamb, G. D. (2008). Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 586: 2203-2216.
- Westerblad, H., Duty, S. and Allen, D. G. (1993). Intracellular calcium concentration during low-frequency fatigue in isolated single fibers of mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 75: 382-388.

