

博士論文

一週性あるいは慢性的な筋活動が筋小胞体の
Ca²⁺-調節能力に与える影響

平成10年度

筑波大学大学院 体育科学研究科

安田 俊広

①

博士論文

一過性あるいは慢性的な筋活動が筋小胞体の
Ca²⁺調節能力に与える影響

筑波大学大学院 体育科学研究科

安田 俊広

(平成6年度入学)

指導教官

勝田 茂 教授

目次

I 章. 緒言	1
II 章. 文献研究	4
1. 骨格筋における筋小胞体の機能と構造	4
2. 遅筋線維と速筋線維の筋小胞体の特徴	7
3. 筋小胞体の機能低下が筋の生理機能に与える影響	9
(1) 筋小胞体のCa ²⁺ 取り込み能力の低下と弛緩時間の延長 ..	9
(2) 筋小胞体のCa ²⁺ 取り込み能力の低下が代謝速度に与 える影響	11
4. 一過性の筋収縮活動が筋小胞体Ca ²⁺ -ATPaseに与える影響	11
(1) 高強度短時間運動時	11
(2) 低強度長時間運動時	13
(3) 電気刺激によって引き起こした筋収縮	14
5. 一過性の運動による筋小胞体の機能低下	15
6. 慢性的な筋活動が筋小胞体Ca ²⁺ -ATPaseに与える影響	17
(1) 持久性トレーニング	17
(2) 慢性的電気刺激	17
III 章. 研究の目的および研究課題	20
IV 章. エクセントリックな筋収縮活動後の筋小胞体の 変化 (実験1)	22
1. 目的	22
2. 方法	22
(1) 被検動物	22
(2) 実験処置	23
(3) 組織学的観察	25
(4) 筋水分含有量	25
(5) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	25
(6) 統計	28
3. 結果	28

(1) 組織化学的分析	28
(2) 筋水分含有量	28
(3) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	31
4. 考察	33
5. 要約	34

V章. 一過性の高強度疲労困憊運動が筋小胞体の

Ca ²⁺ 調節能力に与える影響 (実験2)	35
1. 目的	35
2. 方法	35
(1) 被検動物および運動プロトコール	36
(2) 被検筋および筋タンパクの抽出	36
(3) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	36
(4) 筋水分含有量	37
(5) 筋中乳酸濃度	37
(6) 統計処理	38
3. 結果	38
(1) 運動時間および筋水分含有量	39
(2) 筋中乳酸濃度	39
(3) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	39
(4) FITCによる筋小胞体Ca ²⁺ -ATPaseの評価	39
(5) Ca ²⁺ -ATPaseのATP, Ca ²⁺ に対する親和性の評価	44
4. 考察	44
5. 要約	48

VI章. 一過性の低強度疲労困憊運動が筋小胞体の

Ca ²⁺ 調節能力に与える影響 (実験3)	50
1. 目的	50
2. 方法	50
(1) 被検動物および運動プロトコール	50
(2) 被検筋および筋タンパクの抽出	51
(3) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	51
(4) 筋グリコーゲン含量	51
(5) 統計処理	51

3. 結果	52
(1) 運動時間および筋水分含有量	52
(2) 筋グリコーゲン濃度	52
(3) Ca ²⁺ -ATPase活性	52
(4) Ca ²⁺ -ATPaseのATP, Ca ²⁺ に対する親和性の評価	52
4. 考察	55
5. 要約	57
VII章. 持久性トレーニングによる筋小胞体	
Ca ²⁺ -ATPase活性の変化 (実験4)	59
1. 目的	59
2. 方法	59
(1) 被検動物および運動プロトコール	60
(2) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	60
(3) クエン酸合成酵素 (CS) 活性	60
(4) ミオシン重鎖分子種	61
(5) 統計処理	62
3. 結果	62
(1) CS活性およびミオシン重鎖アイソフォーム	62
(2) 筋小胞体Ca ²⁺ -ATPase活性	62
4. 考察	66
5. 要約	68
VIII章. 討論	69
IX章. 総括	73
謝辞	77
引用文献	78

略号と記号

本論文で用いる略号と記号は以下の通りである。

- ANOVA**, analysis of variance 分散分析
ADP, adenosine diphosphate アデノシン二リン酸
AMP, adenosine monophosphate アデノシン一リン酸
ATP, adenosine triphosphate アデノシン三リン酸
ATPase, adenosine triphosphatase アデノシントリフォスファターゼ
Ca²⁺, calcium ion カルシウムイオン
CaCl₂, calcium chloride 塩化カルシウム
CS, citrate synthase クエン酸合成酵素
DTNB, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
VD, deep vastus lateralis 外側広筋深層部位
ECC, eccentric contraction 伸張性収縮
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA, ethylene glycol-bisN, N, N', N'-tetraacetic acid
ExR group, exhaustive running group
FITC, fluorescein isothiocyanate
Hepes, N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
ISO, isometric contraction 等尺性収縮
KCl, potassium chloride 塩化カリウム
KClO₄, potassium perchlorate 過塩素酸カリウム
KHCO₃, potassium hydrogen carbonate 炭酸水素カリウム
LDH, lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素
MgCl₂, magnesium chloride 塩化マグネシウム
MHC, myosin heavy chain ミオシン重鎖
MRI, magnetic resonance imaging 磁気共鳴映像法
NAD, nicotinamide adenine dinucleotide
NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NaN₃, sodium azide アジ化ナトリウム

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS, sodium dodecyl sulfate ドデシル硫酸ナトリウム

SH, sulfhydryl

SOL, soleus ヒラメ筋

SR, sarcoplasmic reticulum 筋小胞体

TEMED, N, N, N',N'-tetramethyl-ethylenediamine

Tris, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol トリス

type I fibre, 遅筋線維

type IIa fibre, 速筋線維のサブタイプの一つ

type IIb fibre, 速筋線維のサブタイプの一つ

$\dot{V}O_2\text{max}$, maximum oxygen uptake 最大酸素摂取量

この論文は次の原著論文に未発表の実験結果を加えてまとめられている。

1. Toshihiro Yasuda, Kei Sakamoto, Kazunori Nosaka, Masanobu Wada and Shigeru Katsuta : Loss of sarcoplasmic reticulum membrane integrity after eccentric contractions. *Acta Physiol. Scand.* 161: 581-582, 1997.

2. 稲嶋修一郎, 安田俊広, 稲水 惇, 和田正信, 勝田 茂 : 疲労困憊に至る運動が筋小胞体ATPaseに及ぼす影響-短時間運動と長時間運動の比較-. *体力科学* 47: 63-72, 1998.

3. Toshihiro Yasuda, Shuichiro Inashima, Shinya Sasaki, Kunio Kikuchi, Shigemitsu Niihata, Masanobu Wada and Shigeru Katsuta: Effects of exhaustive exercise on biochemical characteristics of sarcoplasmic reticulum from soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.* 164, 1998 (in press).

1章. 緒言

運動の原動力は骨格筋の収縮力であり、我々は筋収縮によって発生する力を利用して、走ったり、跳んだりといった様々な身体活動を行っている。したがって、筋の収縮能力はパフォーマンスを決定する上で重要な要因として考えられる。筋の収縮能力を決定する要因は、中枢性因子から筋細胞内の末梢性因子まで数多く考えられるが、最終的に筋収縮を発揮する細胞内における事象が筋の収縮能力を考慮する上で重要になるであろう。

筋細胞内において筋収縮を制御するシグナルは Ca^{2+} であり、筋弛緩時、 Ca^{2+} は $0.1 \mu\text{M}$ 以下という極めて低い濃度に維持されている。筋収縮の指令が筋に伝わると、細胞内の Ca^{2+} 濃度は $1-10 \mu\text{M}$ に上昇し、それがトリガーとなって筋が収縮する。このようにして、細胞内の Ca^{2+} は筋収縮情報を伝達するセカンドメッセンジャーとして機能しているが、その他にもATPの再合成に関与するエネルギー代謝系の酵素活性（ミトコンドリア内の酵素など）を調節したり、筋線維タイプの変化に関与するなど、様々な骨格筋の生理反応に関係している。このことは骨格筋が正常に機能を発揮するためには、細胞内 Ca^{2+} の恒常性を維持することが必須の条件であることを示唆している。

筋細胞内の Ca^{2+} は筋小胞体と呼ばれる細胞内小器官によって制御されている。筋小胞体の膜上には Ca^{2+} 依存性ATPase(Ca^{2+} -ATPase)が存在し、細胞内の Ca^{2+} を能動的に筋小胞体内腔へ取り込むことによって、細胞内の Ca^{2+} 濃度を低下させている。取り込まれた Ca^{2+} は筋小胞体内に保持され、筋小胞体の膜が正常に機能している限り細胞内へ Ca^{2+} が漏洩することはな

い。そして、筋収縮のための刺激を受けると筋小胞体から Ca^{2+} が放出される。このように筋小胞体の機能は、 Ca^{2+} 取り込み能力と Ca^{2+} 保持能力、そして Ca^{2+} の放出能力の3つに分類することができる(山下 1996)。このうち Ca^{2+} 取り込み能力と Ca^{2+} 保持能力は、細胞内の Ca^{2+} を低レベルに維持し、 Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして機能するために重要な能力である。これらの能力が破綻すると、筋細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加し、セカンドメッセンジャーとしての機能が損なわれるばかりでなく、細胞内のタンパク分解酵素やリン脂質分解酵素が活性化し、場合によっては細胞死を引き起こすと考えられている。

このように筋小胞体は細胞内の Ca^{2+} の調節に重要な役割を果たしているが、周りの環境の変化によってその能力が低下することがin vitroの実験で明らかにされている。その変化とは、 Ca^{2+} 濃度の増加やpHの低下、ATPの減少、活性酸素の増加、グリコーゲンの枯渇などである。このような現象は運動をした際においても細胞内に起こりうることであるが、運動をした際に筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力や筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力に変化が生じるかどうかについて詳細な研究はなされていない。

そこで本研究はまずはじめに一過性の運動について、細胞内の Ca^{2+} が増加し、その結果筋損傷が生じると考えられているエクセントリックな筋収縮刺激、あるいはpHの低下が生じると考えられる高強度疲労困憊運動、そして活性酸素の増加やグリコーゲンの枯渇が生じる低強度疲労困憊運動を行った際に、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力や筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力に変化が生じるかどうかについて、 Ca^{2+} -ATPase活性の変化を手がかりに検討し、続いて、慢性的な運動(持久性トレーニング)を行い、一過性の運動による Ca^{2+} 調節能力の変化が毎回の運動で生じているのか、あるいは運動に

適応し変化が起きなくなるのかという問題に対して検討した。

1. 実験的検討による適応の持続性

動物実験による適応の持続性に関する研究は、動物の行動や生理的状態を測定し、適応が持続するかどうかを確認している。例えば、動物が新しい環境に適応した後、元の環境に戻ると、適応が持続するかどうかを確認している。

動物の行動や生理的状態を測定し、適応が持続するかどうかを確認している。例えば、動物が新しい環境に適応した後、元の環境に戻ると、適応が持続するかどうかを確認している。また、動物の行動や生理的状態を測定し、適応が持続するかどうかを確認している。

動物の行動や生理的状態を測定し、適応が持続するかどうかを確認している。例えば、動物が新しい環境に適応した後、元の環境に戻ると、適応が持続するかどうかを確認している。また、動物の行動や生理的状態を測定し、適応が持続するかどうかを確認している。

II 章. 文献研究

1. 骨格筋における筋小胞体の機能と構造

筋小胞体は筋原線維をとりまくように網状に存在し、横紋周期と一致した周期を持っている。T管に接する部分は膨大して終末槽を形成し、T管を両側からはさんで三つ組み構造(Triad)を形成している(図1)。

筋小胞体は細胞内の Ca^{2+} 濃度を制御することにより骨格筋の収縮・弛緩をコントロールしている。骨格筋収縮の指令が活動電位として筋膜へ伝わると、T管の電圧センサーが刺激され、筋小胞体の終末槽から Ca^{2+} が放出される。細胞内に拡散した Ca^{2+} はトロポニンCに結合し、ミオシクロスブリッジの変化を引き起こして筋を収縮させる。筋が弛緩するとき、筋小胞体膜上の Ca^{2+} ポンプ(Ca^{2+} -ATPase)により筋小胞体の縦走管に Ca^{2+} が取り込まれ、トロポニンCから Ca^{2+} が解離し、クロスブリッジが元に戻る(図2)。

細胞内の Ca^{2+} は、筋弛緩時と収縮時では1万倍近い濃度勾配があり、この大きな濃度勾配は筋小胞体の Ca^{2+} -ATPaseによって維持されている。 Ca^{2+} を筋小胞体内腔に取り込む Ca^{2+} ポンプの本体は Ca^{2+} -ATPaseであり、そのタンパクは、筋小胞体タンパク質の80から90%を占めている。 Ca^{2+} -ATPaseは分子量約100K Daの膜タンパク質で、約 10^{-7}M 以上の Ca^{2+} によって、 Ca^{2+} 濃度に依存して活性化され、ATPのエネルギーを使って Ca^{2+} を筋小胞体の外から内に転移させる。その際1分子のATPで2分子の Ca^{2+} が輸送される。

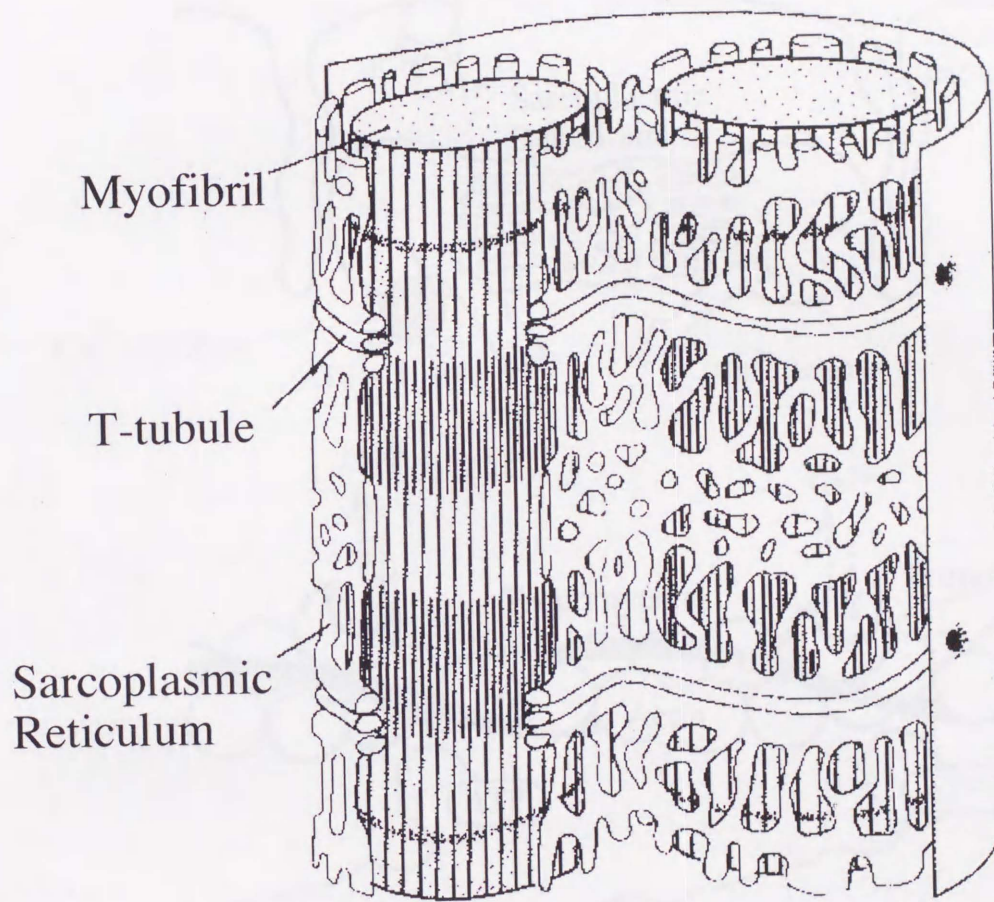


Fig. 1 Structure of skeletal muscle.

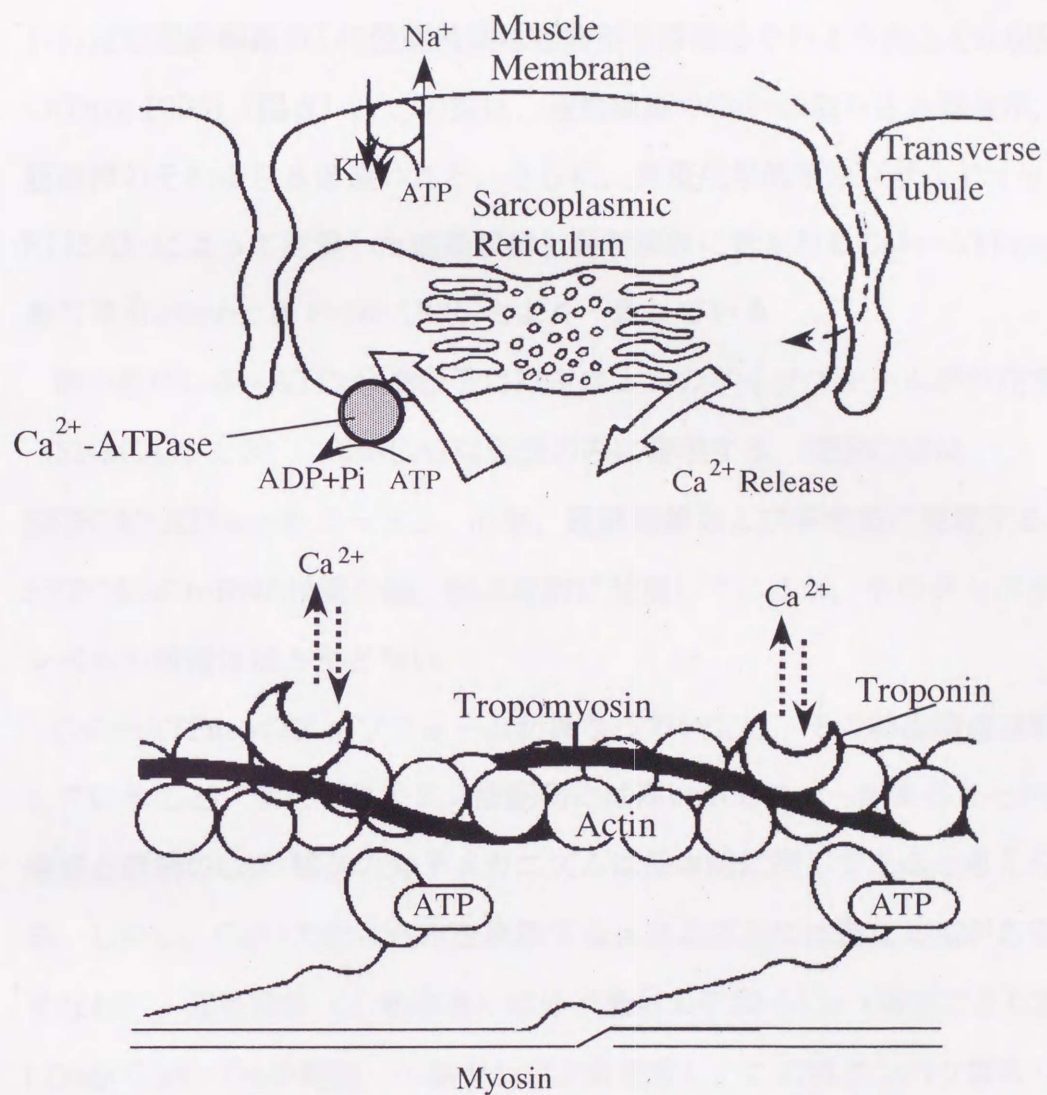


Fig. 2 A diagrammatic representation of the major components of a muscle cell involved in excitation- contraction (E-C) coupling.

(Fitts & Metzger 1988)

2. 遅筋線維と速筋線維の筋小胞体の特徴

速筋線維は遅筋線維に比べ収縮速度が速い。また弛緩時間も同様に、ラットの速筋型筋線維の1/2弛緩時間は遅筋型筋線維のそれよりおよそ6.6倍速い(Dux 1993) (図3)。この差は、速筋線維のCa²⁺の取り込み速度が、遅筋線維のそれより6倍速いこと、さらに、免疫化学的手法(サンドイッチELISA)によって定量した速筋線維と遅筋線維に含まれるCa²⁺-ATPase含量の差(Leberer & Pette 1986)とよく一致している。

筋小胞体Ca²⁺-ATPase遺伝子には主に3つのアイソフォームが存在する(SERCA1, 2, 3)。SERCA1は速筋のみに発現する。SERCA2は、SERCA2 ATPaseをコードし、心筋、遅筋線維および平滑筋に発現する。SERCA3のmRNAは胃や腸、肺の細胞に発現しているが、そのタンパク質レベルの情報はほとんどない。

Ca²⁺-ATPaseのアイソフォームが異なっても、その結晶構造は類似していること、またそのアミノ酸配列には高いホモロジーがあることから、速筋と遅筋のCa²⁺輸送の分子メカニズムは基本的に同じであると考えられる。しかし、Ca²⁺の取り込みを調節するメカニズムには異なる点がある。すなわち、遅筋線維(心筋線維)は分子量およそ22-kDa(報告により20-kDaから30k-Daの範囲)の膜タンパク質を有し、この膜タンパク質のリン酸化によりCa²⁺輸送が促進される。この膜タンパク質はホスホランバンと呼ばれ(Jorgensen & Jones 1986)、cAMP依存性プロテインキナーゼによりリン酸化を受ける(LePeuch & Demaille 1989)。速筋線維にはこのホスホランバンが存在しない。cAMP依存性プロテインキナーゼによるホスホランバンリン酸化の程度と、Ca²⁺輸送速度の促進の程度とはよく相関する。

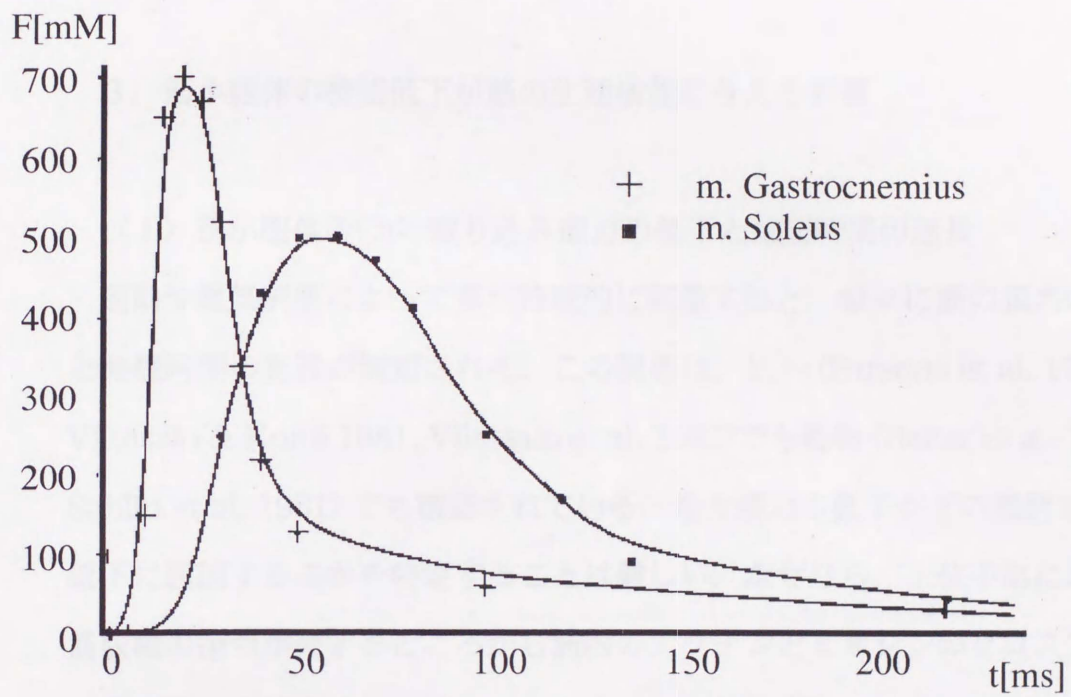


Fig. 3 Single-twitch contractions of rabbit fast and slow muscles.

(Dux, 1993)

Ca²⁺輸送速度のCa²⁺濃度依存性曲線で見ると、ホスホランバンのリン酸化によりこの曲線は低Ca²⁺濃度の方へ平行移動し、Ca²⁺に対する見かけの親和性が増加し（図4）、Ca²⁺輸送機能とATP加水分解の増加を導く(Dux 1993)。このようにして、遅筋線維には速筋線維にないCa²⁺輸送の調節メカニズムを有している。

3. 筋小胞体の機能低下が筋の生理機能に与える影響

(1) 筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低下と弛緩時間の延長

運動や電気刺激によって筋が持続的に収縮すると、徐々に筋の張力の低下と弛緩時間の延長が観察される。この現象は、ヒト(Parsons et al. 1992, Viitasalo & Komi 1981, Viitasalo et al. 1982)でも動物(Baker et al. 1995, Sahlin et al. 1981)でも確認されている。最大張力の低下がどの部位の機能低下に起因するのかを特定することは難しい。なぜなら、上位中枢において筋収縮の指令が発するところから筋内のアクチンとミオシンのクロスブリッジ形成まで多くの部位で機能不全が生じる可能性があるからである。一方、弛緩時間の延長は筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低下(Williams & Klug 1995)、もしくは、アクチンとミオシンの分離速度の低下(Westerblad & Allen 1993)からほぼ説明することができる。Gollnick et al. (1991)は、ヒトの動的膝伸展運動後に、外側広筋の最大随意収縮力の低下と弛緩時間の延長を確認し、その際の弛緩時間と筋小胞体のCa²⁺取り込み速度との間に負の相関関係があることを示した。さらにAllen et al. (1989)は、単一筋線維レベルで張力と細胞内Ca²⁺濃度を測定し、細胞内Ca²⁺濃度の変化から、疲労時の張力の低下や弛緩の延長の多くを説明できることを示唆している。

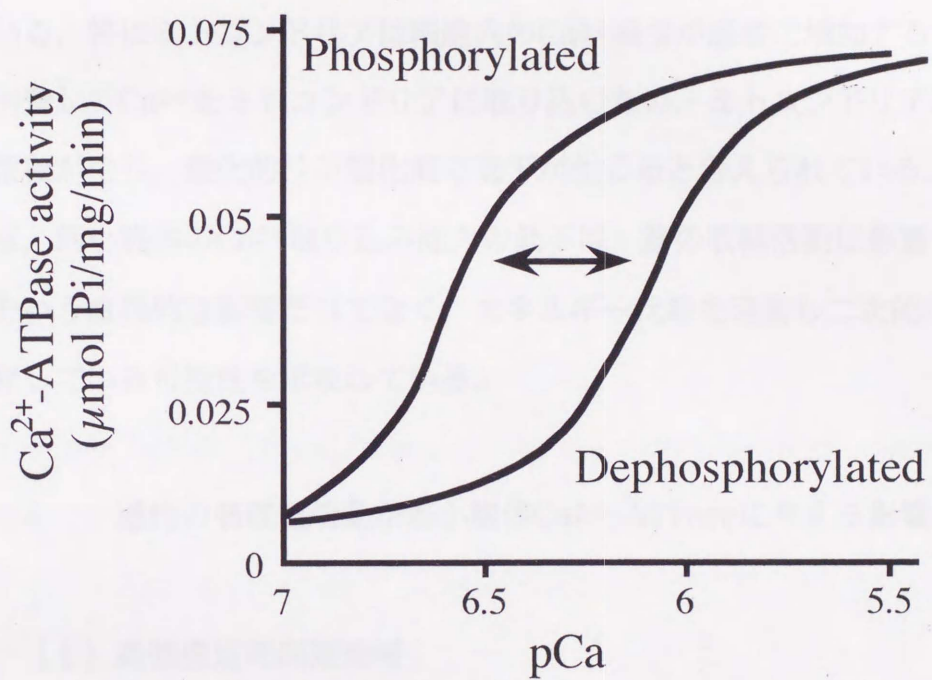


Fig. 4 Phosphorylation of the phospholamban increases the calcium affinity of the Ca²⁺-ATPase.

(2) 筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低下が代謝速度に与える影響

筋細胞内のCa²⁺は張力のトリガーとしてのみ機能しているわけではなく、種々の生理反応のセカンドメッセンジャーとしても重要な役割を持っている。例えば、細胞質においてはカルモジュリンと結合し、グリコーゲンの分解を調節しており、またミトコンドリア内の酵素の活性調節にも関係している。特にミトコンドリアは細胞内のCa²⁺濃度が過度に増加するとATPを消費してCa²⁺をミトコンドリアに取り込むため、ミトコンドリア内にCa²⁺蓄積が生じ、酸化リン酸化能の低下が生じると考えられている。このことは、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低下は、筋の収縮活動に影響を与えるという直接的な影響だけでなく、エネルギー代謝を阻害し二次的な疲労を誘発している可能性を示唆している。

4. 一過性の筋収縮活動が筋小胞体Ca²⁺-ATPaseに与える影響

(1) 高強度短時間運動時

高強度運動が筋小胞体の機能に与える影響について観察した研究はわずかしかない。Bonner et al. (1976)はラットにトレッドミル走を行わせた後、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力を測定した。この運動は8分間で疲労困憊に至っているがCa²⁺取り込み能力に変化は起きていない。一方、Byrd et al. (1989b)はウマを疲労困憊まで走らせたとき（平均走行時間、4.65分）、筋小胞体のCa²⁺-ATPase活性やCa²⁺取り込み速度が低下することを報告している。上記の2つの研究結果の違いが生じる原因として、実験に用いた種の違いがあげられる。例えば、ウマの筋小胞体のATPaseはラットの25%程度

であることが電気泳動を用いた実験で確かめられている。

高強度運動の場合、エネルギー供給の大部分が無酸素性過程によって供給されるため、高エネルギーリン酸 (ATP, PCr) の枯渇 (Spande & Schottelius 1970) や pH の低下 (H^+ の蓄積) が生じ、それらが筋小胞体の能力に影響を与える可能性が考えられる。実際、 Ca^{2+} -ATPase は生理的な ATP 濃度 (1-5 mM) で最大活性を示し、ATP 濃度が 20-100 μ M に低下すると ATPase 活性も 2 分の 1 に低下する (Stienen et al. 1993)。しかしながら、疲労した筋であっても、細胞内の ATP 量はほとんど変化しないので (Kuno et al. 1992)、ATP の枯渇が酵素活性を低下させるとは考えにくい。しかしながら、核磁気共鳴法による評価や全筋レベルで生化学的に測定した濃度では測定できない局所レベルでの ATP 濃度の低下が生じている可能性は否定できない。Korge & Campbell (1994) は、クレアチンキナーゼとクレアチンリン酸系 (CK-CP system) による ATP の再合成が、 Ca^{2+} のポンプ機能に重要な役割を果たしていることを示唆しており、高エネルギーリン酸の低下は特に *in vivo* の条件では重要かもしれない。ATP 濃度減少の影響を完全に取り除くことはできない。

高強度運動後に筋中乳酸が増加する。多くの研究者によって乳酸の蓄積に伴う pH の低下が Ca^{2+} -ATPase 機能に影響を与えることが認められている (Baker et al. 1995, Mandel et al. 1982, Metzger & Fitts 1987, Williams & Ward 1992)。細胞内に増加した H^+ は、 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 結合部位に競合的に結合することにより、酵素活性を阻害すると考えられている (Inesi & Hill 1983, Mandel et al. 1982)。しかしながら、Dettbarn & Palade (1991) は、pH 6.6 程度の低下では Ca^{2+} -ATPase 活性に影響を与えないことも示唆しており、pH の低下に相反する結果が報告されているのも事実で

ある。Cady et al. (1989)はフォスホリラーゼ欠損症の患者において、動的運動時に筋 pHが変化しないにもかかわらず弛緩が遅延することを認め、弛緩の遅延がpHに依存的な要因と非依存的な要因によって引き起こされていると結論づけている。これらの矛盾する実験結果は、 H^+ 濃度に対する Ca^{2+} -ATPaseの影響に2つのステップが存在することを示唆しているのかもしれない (Williams & Klug 1995)。

(2) 低強度長時間運動時

低強度で疲労困憊まで運動を継続すると、筋グリコーゲンが枯渇する (Armstrong et al. 1974, Coyle 1992, Ferry et al. 1992)。筋グリコーゲンの枯渇にともない糖代謝に関連する酵素 (ホスホリラーゼキナーゼ、ホスホリラーゼホスファターゼ) の活性が変化すると Ca^{2+} -ATPaseの活性値にも影響を与える (Hörl & Heilmeyer 1978)。さらにBrautigam et al. (1979)は α -アミラーゼ処理によりskinned fiberからグリコーゲンとその関連酵素を取り除くと、筋小胞体による Ca^{2+} 取り込みが低下することを示した。グリコーゲンの分解が Ca^{2+} によって調節されていることを考えると、筋グリコーゲンの枯渇といった極限的状态が、筋小胞体に影響を与えることは十分考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。

運動に伴い筋細胞内にフリーラジカルが増加する (Reid et al. 1992, Radák et al. 1995)。このフリーラジカルはミトコンドリアにおける酸化リン酸化に由来すると考えられている。Scherer & Deamer (1986)は、筋小胞体サンプルを過酸化水素にさらすと、 Ca^{2+} -ATPase活性や Ca^{2+} 取り込み速度が低下することを確認し、この低下が脂質の酸化によるものではな

く、直接Ca²⁺-ATPaseのSH基を修飾し活性を阻害していることを示唆している。したがって運動中、特に酸化筋線維において、フリーラジカルの産生が筋小胞体の機能を低下させている可能性がある(Hess et al. 1981)。

(3) 電気刺激によって引き起こした筋収縮

筋に一過性の電気刺激を加えると張力の低下と弛緩時間の延長が起きる。この時の筋内のCa²⁺濃度を観察すると収縮時の細胞内Ca²⁺濃度の低下と、弛緩時のCa²⁺消失速度の低下が観察されることから、筋小胞体のCa²⁺放出能力および取り込み能力が低下していることが示唆されている(Westerblad & Allen 1993)。

また、低頻度の電気刺激により引き起こした張力の低下が24時間以上つづくことがある。このSlow recoveryと呼ばれる現象は激しい筋収縮によって、細胞が損傷した結果、生じると考えられている(Brotto & Nosek 1996, Bruton et al. 1998)。筋細胞の損傷は、筋がエクセントリックな収縮を行ったときに特に顕著に観察され、光学・電子顕微鏡下で観察すると、Z帯の流出や崩壊、収縮タンパクの構造的な変化が生じている。エクセントリックな収縮を含む筋活動が刺激となって細胞内Ca²⁺が増加すると、細胞内のCa²⁺依存性のプロテアーゼやホスホリパーゼを活性化して損傷が生じる。この概念は、カフェインやCa²⁺イオノフォアで筋をインキュベーションして細胞内のCa²⁺濃度を増加させると、筋損傷が生じること、さらにこの溶液からCa²⁺を取り除くと損傷が軽減することから支持される。

細胞内のCa²⁺が増加する際、その経路には細胞外からの流入と筋小胞体からの漏洩の二つの経路が考えられる。ダウンヒル走後のラットのヒラメ筋を摘出し、Ca²⁺ (3 mM)を含む溶液中にインキュベーションすると、筋中の

総Ca²⁺濃度が増加することから (Duan et al. 1990), 細胞膜の崩壊により細胞外からCa²⁺が流入している可能性がある。一方, 細胞内において大量にCa²⁺をプールしている筋小胞体の関与については, エクセントリックな収縮後に, 筋小胞体の膨張や結晶化が観察されているが (Fridén & Lieber 1996), Ca²⁺漏洩の直接的証拠を示した研究はない。Byrd et al. (1989a)はCa²⁺イオノフォアを使って筋小胞体膜の損傷を評価し, 走運動では膜に損傷が生じないことを示唆している。一方, Fitts et al. (1982)はラットの長時間水泳運動後にCa²⁺の取り込み速度の低下を観察し, 筋小胞体膜の損傷によりCa²⁺が細胞内へ流入している可能性を示唆している。このような結果の違いは, 用いた運動形態や強度の違いに起因すると思われる。

5. 一過性の運動による筋小胞体の機能低下

Williams & Klug (1995) は, 筋疲労時の筋小胞体の機能低下は, 筋に不可逆的な損傷を生じさせないための"circuit breaker"もしくは"thermostat"の役割を果たしているという仮説を提唱している。つまり, 身体活動による細胞内の変化は筋小胞体の機能低下により筋疲労を引き起こし, 不可逆的な損傷が生じることを防いでいるが, 筋小胞体の機能的・構造的変化が生じると, 筋に損傷を引き起こしてしまうとする考え方である (図5)。この概念は, 運動誘発性の筋損傷は細胞内のCa²⁺濃度の上昇により生じるかもしれないこと (Armstrong 1990), 細胞内Ca²⁺濃度の上昇が, 細胞外Ca²⁺の流入ではなく, 筋小胞体のCa²⁺調節能力の低下によって引き起こされることを示唆した研究 (Byrd 1992, Lowe et al. 1994)によって支持される。

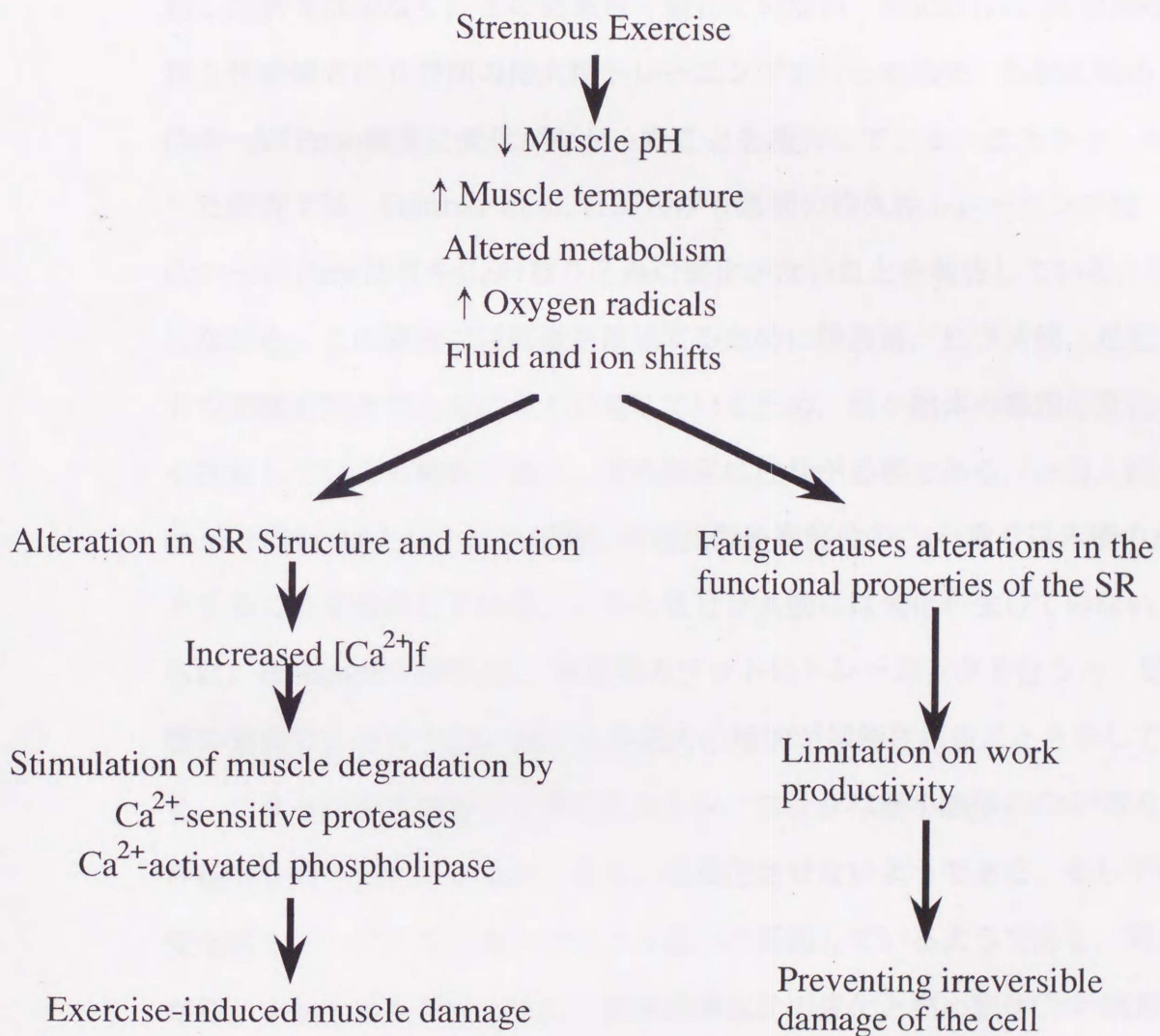


Fig. 5 The possible processes linking alterations in sarcoplasmic reticulum (SR) function with exercise-induced muscle damage.

6. 慢性的な筋活動が筋小胞体Ca²⁺-ATPaseに与える影響

(1) 持久性トレーニング

持久性トレーニングが筋小胞体のCa²⁺調節能力に与える影響について検討した研究は少なく、その結果も一致していない。Madsen et al. (1994)は持久性鍛錬者に6週間の持久性トレーニングを行った結果、外側広筋のCa²⁺-ATPase濃度に変化がなかったことを報告している。またラットを用いた研究では、Bonner et al. (1976)が9週間の持久性トレーニング後Ca²⁺-ATPase活性やCa²⁺取り込みに変化がないことを報告している。しかしながら、この研究では筋量を確保するために腓腹筋、ヒラメ筋、足底筋の3つの筋をひとまとめにして測定しているため、筋小胞体の機能の変化を過小評価している可能性があり、その解釈に注意が必要である。一方、Kim et al. (1981)はトレーニング後に外側広筋表層部位のCa²⁺取り込み能力が低下することを報告している。このときヒラメ筋には変化が生じていない。さらに、Belcastro(1987)は、発育期のラットにトレーニングを行うと、足底筋の発育にともなうCa²⁺取り込み能力の増加が抑制されることを示している。これらの研究結果から考えるとトレーニングは筋小胞体のCa²⁺取り込み能力を若干低下させるか、あるいは変化させないようである。そしてその変化はトレーニング強度や筋による違いに起因しているようである。残念ながら、トレーニングにともなう筋線維構成比の変化と筋小胞体Ca²⁺調節能力の変化を同時に検討した研究はない。

(2) 慢性的電気刺激

骨格筋に長期間の電気刺激を負荷する実験は、慢性的な活動量増加のモデル

ルとしてよく用いられている。走運動では筋の動員をコントロールすることができないのに対して、電気刺激では目的とする筋を特異的に収縮させることが可能であり、筋活動の影響を明確に観察することができる。ウサギの速筋線維に慢性的電気刺激を行うと、わずか2日後には Ca^{2+} の取り込み能力が50%低下し (Leberer et al. 1987), それに付随して弛緩時間の延長が観察される (Pette & Vrbová 1985)。刺激8日後、 Ca^{2+} -ATPase活性を50%阻害するのに必要なfluorescein isothiocyanate (FITC ; Ca^{2+} -ATPaseの拮抗阻害剤)の量が減少し (図6), Ca^{2+} -ATPaseのATP結合部位に変化が生じる (Leberer & Pette 1987)。この時、免疫化学的手法によって測定した Ca^{2+} -ATPaseの量は変化しておらず、刺激40-50日後になって、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseの量が低下しはじめ、それに付随しアイソフォームの遅筋化が起きる。このことは、筋小胞体の機能は細胞内の環境変化に応じ極めて変動しやすい性質を持っていることを示している。Hämäläinen & Pette (1997)は、慢性的電気刺激後のミオシン重鎖のアイソフォームと筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseのアイソフォームの変化のパターンを検討し、slowタイプの Ca^{2+} -ATPaseとslow ミオシン重鎖アイソフォームの相対的な濃度との間に高い相関 ($r = 0.97$) 関係を観察し、両者の発現が協調的であることを示唆している。

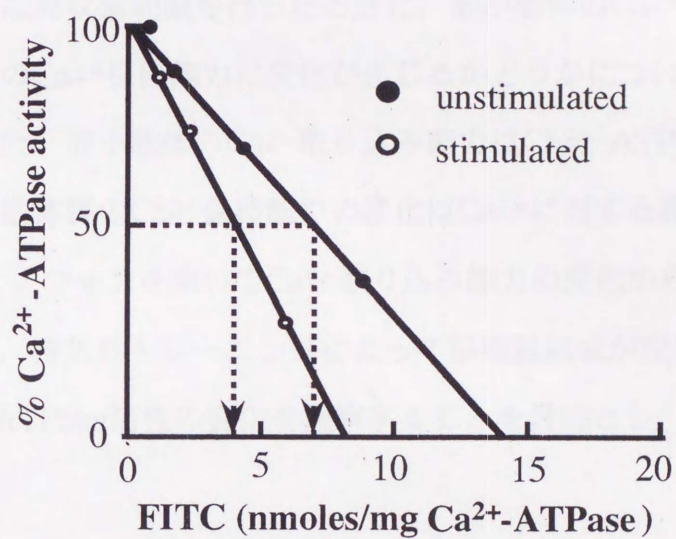


Fig. 6 Inhibition of Ca²⁺-ATPase activity by FITC in sarcoplasmic reticulum from contralateral unstimulated and 8-day-stimulated rabbit fast-twitch EDL muscle.

(Leberer et al. 1987)

III章. 研究の目的および研究課題

これまで述べてきたように、筋細胞内において Ca^{2+} は骨格筋の収縮能力、エネルギー代謝能力そして筋線維組成の変化といった様々な生理反応に関与している。本研究は、筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力を変化させると考えられる様々な筋収縮刺激を行ったときに、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力と筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力に変化が生じるかどうかについて検討することを目的とした。筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力は Ca^{2+} -ATPase活性により評価し、筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力の変化は Ca^{2+} に対する膜の透過性を上げる Ca^{2+} イオノフォアを用いて Ca^{2+} 取り込み能力の変化から評価した。

さらに、持久性トレーニングによって筋線維組成が変化したときの筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性の変化を観察することを目的とし、以下の研究課題を設定した。

1. 電気刺激によって筋にエクセントリックな収縮とアイソメトリックな収縮を与えた際、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力と Ca^{2+} 保持能力に変化が生じるかどうかについて明らかにする（実験1）。

2. 疲労困憊に至る高強度の一過性運動後に、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力と Ca^{2+} 保持能力に変化が生じるかどうかについて明らかにする。さらに、変化の様相を探るため、 Ca^{2+} -ATPaseのATPと Ca^{2+} に対する親和性を評価する（実験2）。

3. 疲労困憊に至る低強度の一過性運動後に、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力とCa²⁺保持能力に変化が生じるかどうかについて明らかにする。さらに、変化の様相を探るため、Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性を評価する（実験3）。

4. 持久性トレーニングにより筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性が変化するか否かについて、さらに持久性トレーニングがその後の一過性の疲労困憊運動後のCa²⁺-ATPase活性の変化に与える影響について明らかにする（実験4）。

IV章. エクセントリックな筋収縮活動後の筋小胞体の 変化 (実験1)

1. 目的

エクセントリックな筋収縮活動を行うと骨格筋に微細レベルで損傷が生じ、これが原因となって筋の張力低下が数日間続くことがある。筋の損傷がどのようなメカニズムで生じるのか、その細胞レベルでの機序は明らかになっていないが、細胞内の Ca^{2+} 恒常性が喪失した結果、 Ca^{2+} 依存性のタンパク分解系が活性化し、損傷が生じると考えられている。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は筋小胞体の構造変化をもたらし、その結果 Ca^{2+} 調節能力に影響を与えている可能性がある。実際、エクセントリックな筋活動や薬品処理により細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させると筋小胞体の膨張が生じることが報告されている。しかしながら光学・電子顕微鏡による形態的な観察では、筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力の変化を知ることはできない。

そこで本実験では、細胞内 Ca^{2+} が増加し、筋損傷が生じるすると考えられるエクセントリックな収縮刺激後に、筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase活性および筋小胞体膜に変化が生じるか否かについて検討することを目的とした。

2. 方法

(1) 被検動物

7週齢のWistar系雄性ラット84匹を被検動物として用いた。ラットはコントロール群 (n = 9), アイソメトリック収縮 (ISO, n = 18) 群, エクセントリック収縮 (ECC, n = 54) 群の3群に分け, ISO群はさらにISO刺激直後およびISO刺激48時間後に解剖する2群に分けた。ECC群はECC刺激直後およびECC刺激2, 4, 12, 24, 48時間後に解剖する群にグルーピングし, 被検筋は前脛骨筋とした。予備実験において, ECC刺激後48時間後に顕著な筋損傷が観察されることから, ISO群は刺激直後と48時間後の筋を用いた。

(2) 実験処置

ラットはペントバルビタールで麻酔した後 (体重1kg当たり50mg), ラットの足をサーボモータに接続してあるホルダーに装着し, 左脚の前脛骨筋にISOとECCを行った。ECCは, 前脛骨筋の皮膚上にあてた電極で刺激すると同時にモーターにより強制的に足底屈させることにより行った (図7)。その際関節角度は30度から最大伸展の180度になるようにした。ISOは足の角度を90度に固定したまま刺激し, 筋を収縮させた。電気刺激は最大張力が発揮される電圧に調節し, duration 0.1ms, frequency 100Hzで行った。ISO, ECCともに4秒毎に一回の収縮を50回行った。

各群のラットから摘出した前脛骨筋は3群に分け, それぞれ筋水分含有量, 組織学的観察, 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の測定に用いた。

Ca²⁺-ATPase活性測定用に摘出した筋は, 剃刀で細かく切断した後, 10倍 (mass/vol.) の抽出液 (400mM Tris, 300mM Sucrose, pH 7.9) でホモジネートし, 液体窒素で瞬間凍結した後, -80°Cで保存した。

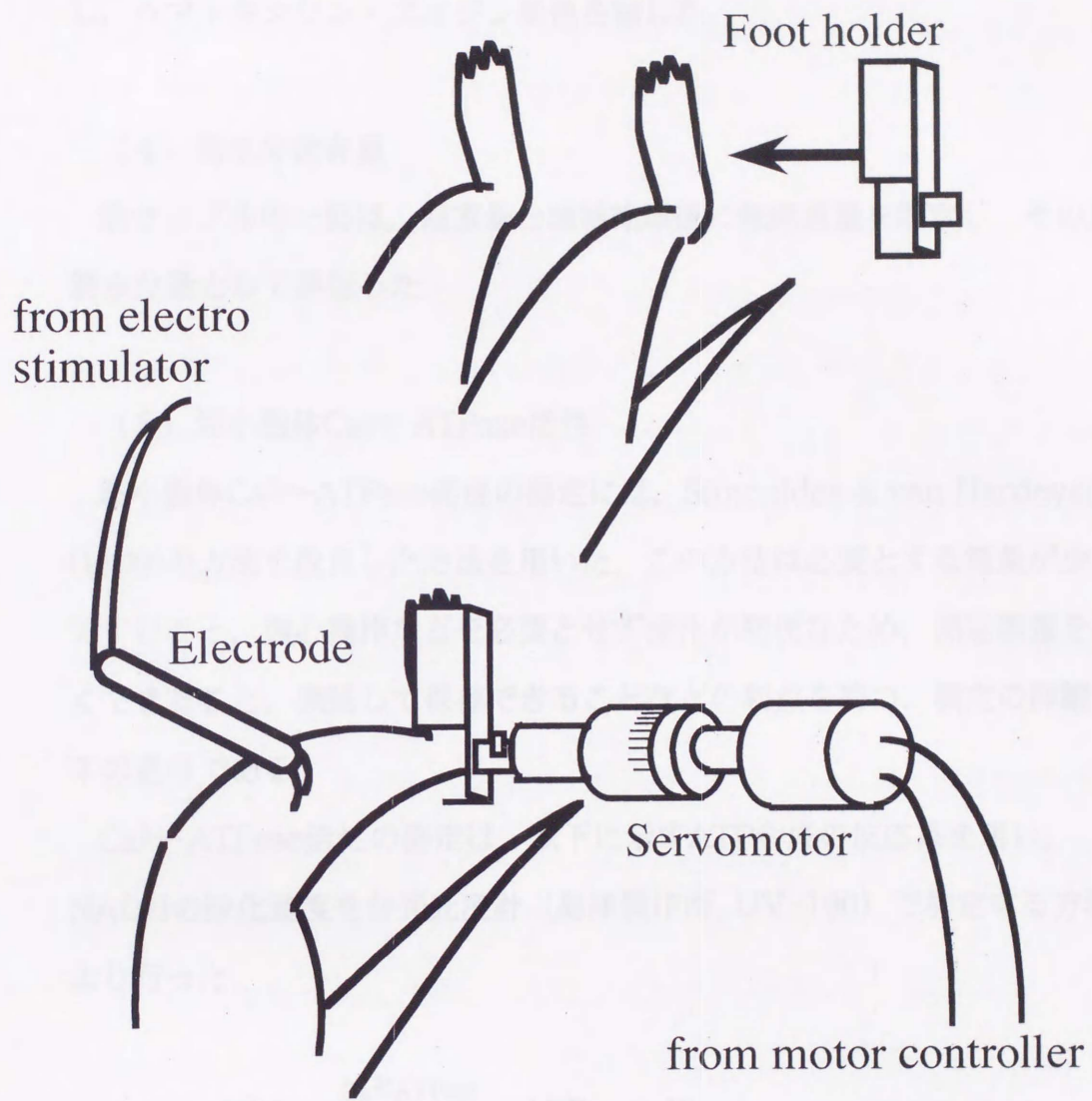


Fig. 7 Schema of experimental device for electrical stimulation that evokes intensive contraction.

(3) 組織学的観察

筋の損傷を評価するため、クリオスタットで10 μ mの横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

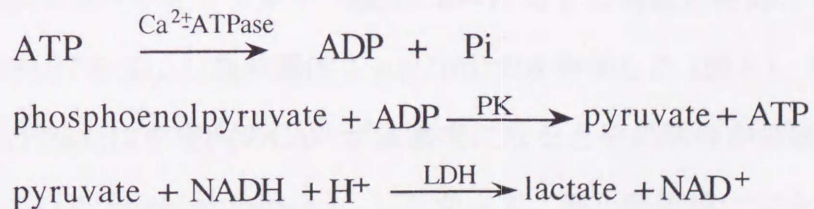
(4) 筋水分含有量

筋サンプルの一部は、湿重量と凍結乾燥後に乾燥重量を測定し、その差を筋水分量として評価した。

(5) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の測定には、Simonides & van Hardeveld (1990)の方法を改良した方法を用いた。この方法は必要とする筋量が少なくすむこと、遠心操作などを必要とせず操作が簡便なため、測定誤差を少なくできること、凍結して保存できることなどの利点を持つ。測定の詳細は以下の通りである。

Ca²⁺-ATPase活性の測定は、以下に示すATP合成の反応系を用い、NADHの酸化速度を分光光度計（島津製作所, UV-190）で測定する方法により行った。



Assay medium (pH 7.5) の組成は、1 mM EGTA, 20 mM HEPES, 200

mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, 0.2 mM NADH, 10 mM phosphoenol pyruvate, 0.8 mM CaCl₂, 18 U/ml pyruvate kinase (PK), 18 U/ml lactate dehydrogenase (LDH)であった。Assay mediumにホモジネートした筋サンプルを10 μ l加えた後, 4 mM ATPを加えることによって反応を開始した。測定は37°Cで行った。

この反応によって得られるATPase活性は筋小胞体のATPase活性だけでなく, ミオシンや筋膜, ミトコンドリアのATPase活性も含まれている (Total ATPase activity)。この条件でまず, サンプルに含まれるすべてのATPase活性を測定する。次に, 高濃度の CaCl₂ (2 M) を19.2 μ l (最終濃度19.2 mM) 加えると, 筋小胞体のCa²⁺-ATPaseのみが阻害された活性値が得られる (Background ATPase activity)。Total activityから Background activityを差し引くと, Ca²⁺-ATPase活性のみの値が算出される。

筋が損傷した場合, 筋の水分含有量が増加することから, 酵素活性はタンパク当たりの活性値で表した。タンパク量はLowry法 (1951) により測定し, ウシ血清アルブミンをスタンダードとした。

運動による筋小胞体の膜の変化は, インキュベーション溶液中に 0.2mg/mlのCa²⁺イオノフォア (膜のCa²⁺に対する透過性をあげる薬品), A23187を10 μ l (最終濃度1 μ g/ml)加え評価した (図8)。筋小胞体のCa²⁺-ATPaseは小胞内のCa²⁺が高濃度になるとその活性が抑制される性質を持っている (backinhibition)。したがって, 筋小胞体膜が完全に機能しているとき (図8上段), Ca²⁺が小胞内に高濃度に蓄積するためCa²⁺-ATPase活性は抑制されている (図8-1)。この時にCa²⁺イオノフォアを添

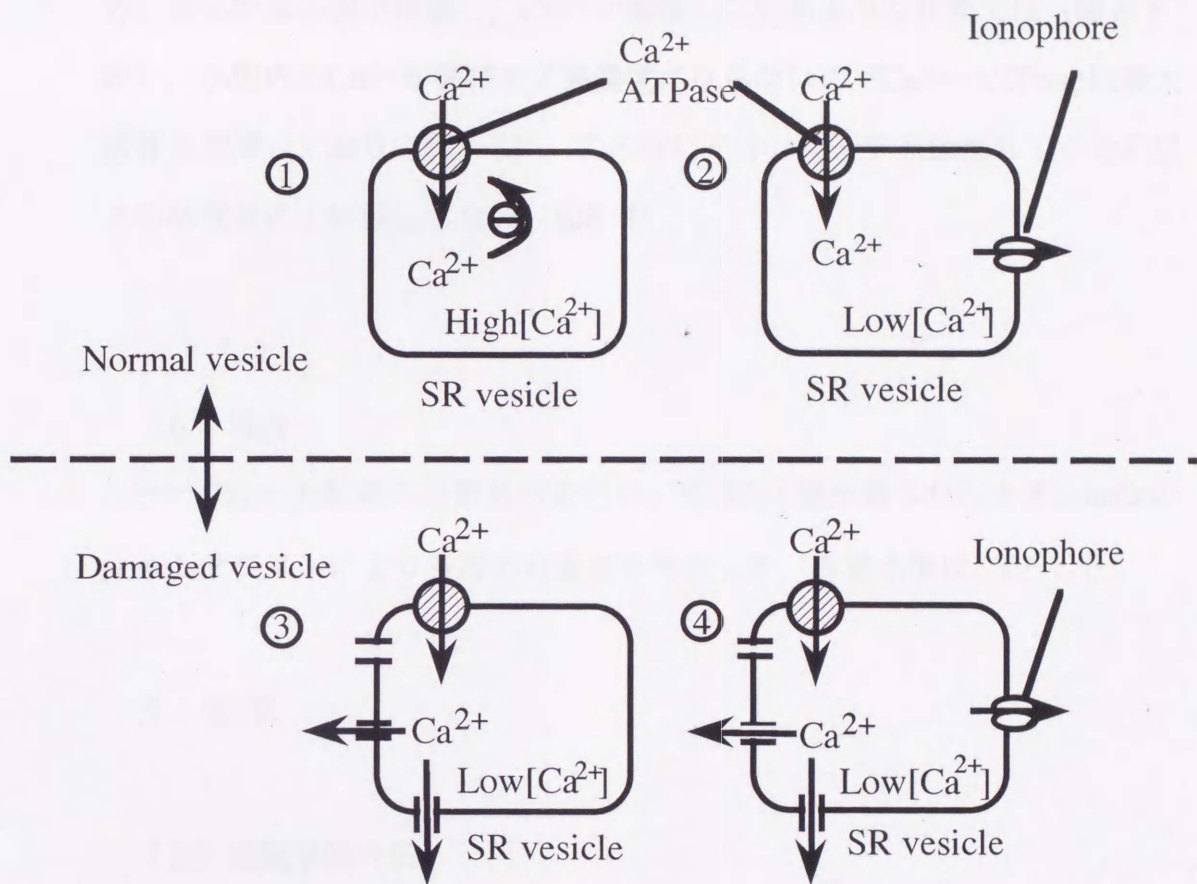


Fig. 8 Illustration of the effects of Ca^{2+} ionophore on sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase activity. Accumulation of intravesicular Ca^{2+} inhibits SR Ca^{2+} -ATPase activity. Incubation of SR in the reaction medium containing Ca^{2+} ionophore elicits an increase in Ca^{2+} permeability of the vesicle membrane. Only intact vesicles display an increase in SR Ca^{2+} -ATPase since the Ca^{2+} concentration in the vesicle is lowered by backflux of Ca^{2+} across the vesicle membrane. In contrast the treatment with Ca^{2+} ionophore does not elevate SR Ca^{2+} -ATPase activity of damaged vesicles that are incapable of sequestering Ca^{2+} .

加すると、小胞内の Ca^{2+} が外に漏れるため、小胞内の Ca^{2+} 濃度が低下し backinhibitionが機能しなくなり Ca^{2+} -ATPase活性が上昇する(図8-2)。一方、筋小胞体の膜が損傷し、 Ca^{2+} が漏洩しているような状態では(図8下段)、小胞内の Ca^{2+} が蓄積せず高濃度にならないので Ca^{2+} -ATPaseは最大活性を発揮しており(図8-3)、この時にイオノフォアを添加してもそれ以上の活性値の上昇は生じない(図8-4)。

(6) 統計

データは一元配置の分散分析を行い、有意なF値が得られたときSchefféの post hocテストにより各群の有意差を検定した。有意水準は5%とした。

3. 結果

(1) 組織学的分析

図9はヘマトキシリン・エオジン染色を施した各群の横断切片を示している。ECC群において刺激12時間後から、細胞間隙があいたり、角の取れた筋線維が観察されはじめ刺激48時間後がもっとも顕著な損傷が観察された。コントロール群とISO群には、ECC群に観察されるような異常な線維は見られなかった。

(2) 筋水分含有量

図10は各群の筋水分含有量を示している。筋が損傷すると筋の水分含有

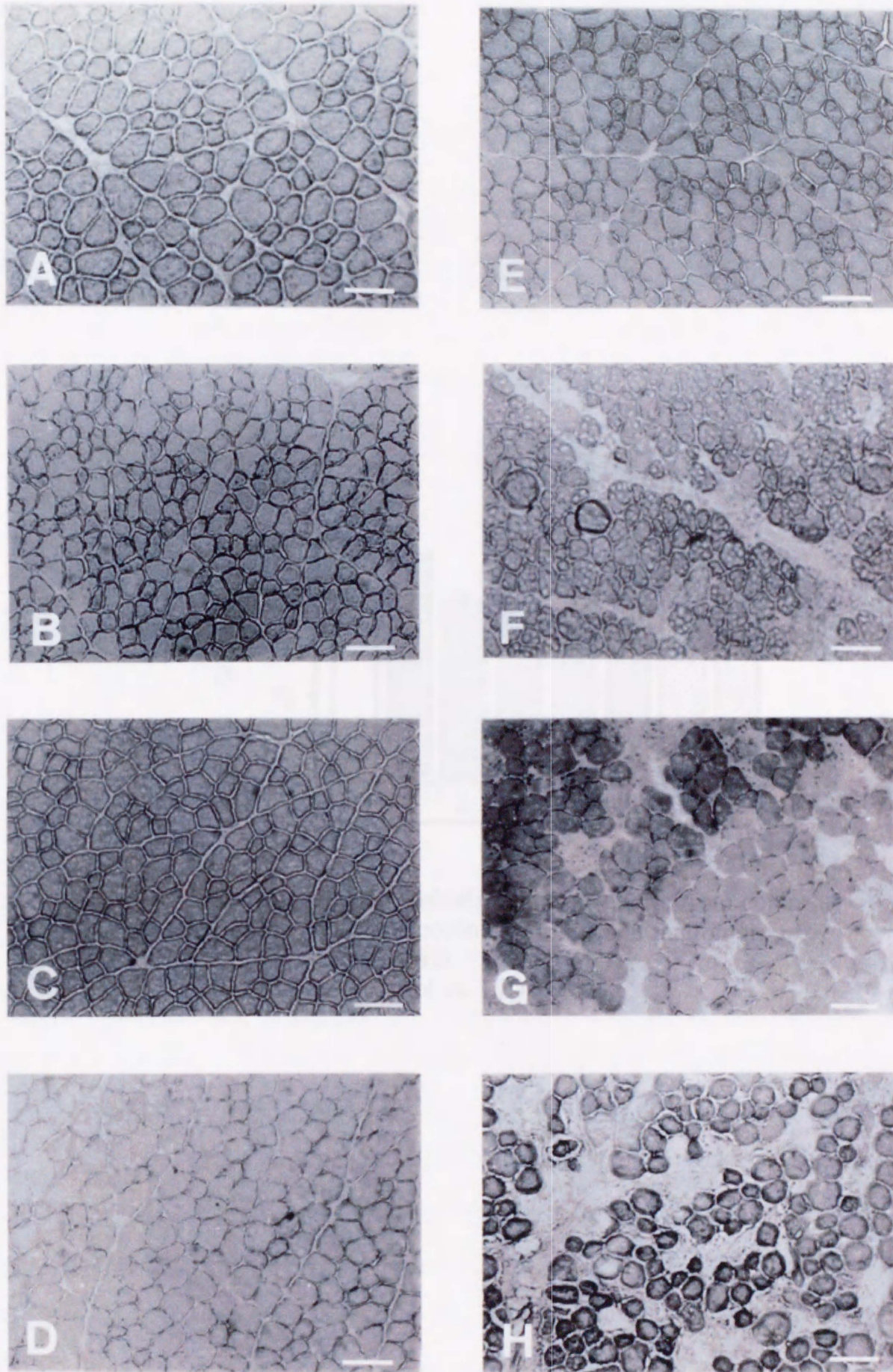


Fig. 9 Transverse sections of the rat tibialis anterior muscle in control (A), 0 (B), 24 (C) h after isometric contractions and 0 (D), 2 (E), 12 (F), 24 (G), and 48 (H) h after eccentric contractions. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Bar = 100µm.

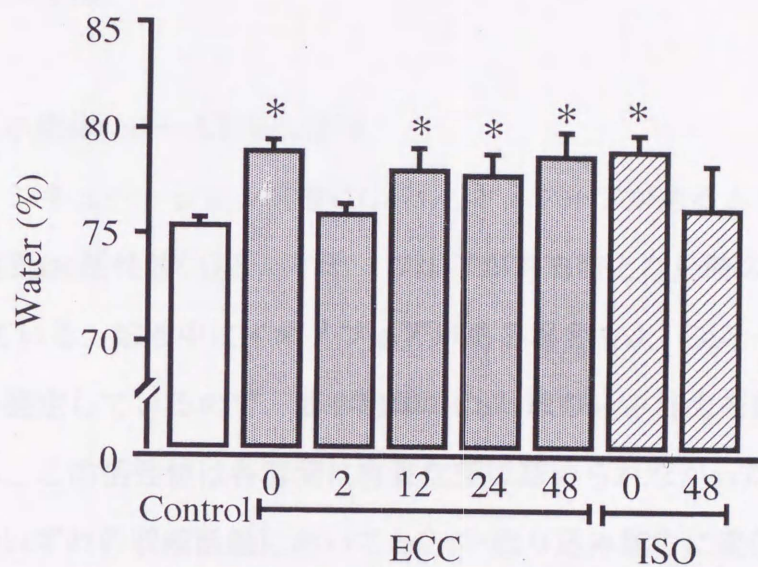


Fig. 10 Percent water in the tibialis anterior muscle from control, isometric (ISO) and eccentric (ECC) contraction groups. Values are means \pm SD
 * $P < 0.05$ for Control vs. ISO and ECC.

量が増加し浮腫が生じることが、MRIを用いたヒトの実験や動物の損傷実験で観察されている(Nosaka & Clarkson 1996). 本研究でも筋損傷の間接的指標として筋水分含有量を測定した. ECC, ISOともに刺激直後に一時的な水分量の増加が観察された. ISO群においては48時間後にコントロールレベルに回復したが, ECC群は2時間後に回復した後, 12時間以降水分が増加したままであった.

(3) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

図11はインキュベーション溶液にCa²⁺イオノフォアがあるときの筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性値(A)と, イオノフォアがある時とない時の活性値の比(B)を示している. 溶液中にイオノフォアがある場合(A), Ca²⁺-ATPaseの最大活性を測定しているのだから, 筋小胞体のCa²⁺取り込み能力を評価することができる. この活性値は各群間に有意な差は認められなかったことから, ECC, ISOいずれの収縮活動においてもCa²⁺取り込み能力に変化は生じていないことを示している. 一方, イオノフォアの有無における活性値の比は(B), Ca²⁺が漏れないように筋小胞体の膜が完全に機能しているかどうかを評価できる. 膜が完全に機能している時は, イオノフォアを加えることによって活性値が1.5-2倍上昇するが, 完全性が失われてCa²⁺が漏洩している場合, その上昇が起きず, 比は1.0に近くなる. 図11-Bに示したように, ECC群の刺激直後および24時間, 48時間後において, イオノフォアを加えることによる活性値の上昇が抑制され, その活性値の比がコントロール群よりも有意に低い値を示した. このことは筋小胞体の膜の完全性が損なわれCa²⁺が筋小胞体内腔から漏洩している可能性を示唆している. ISO群においては, Ca²⁺-ATPase活性に変化は見られなかった.

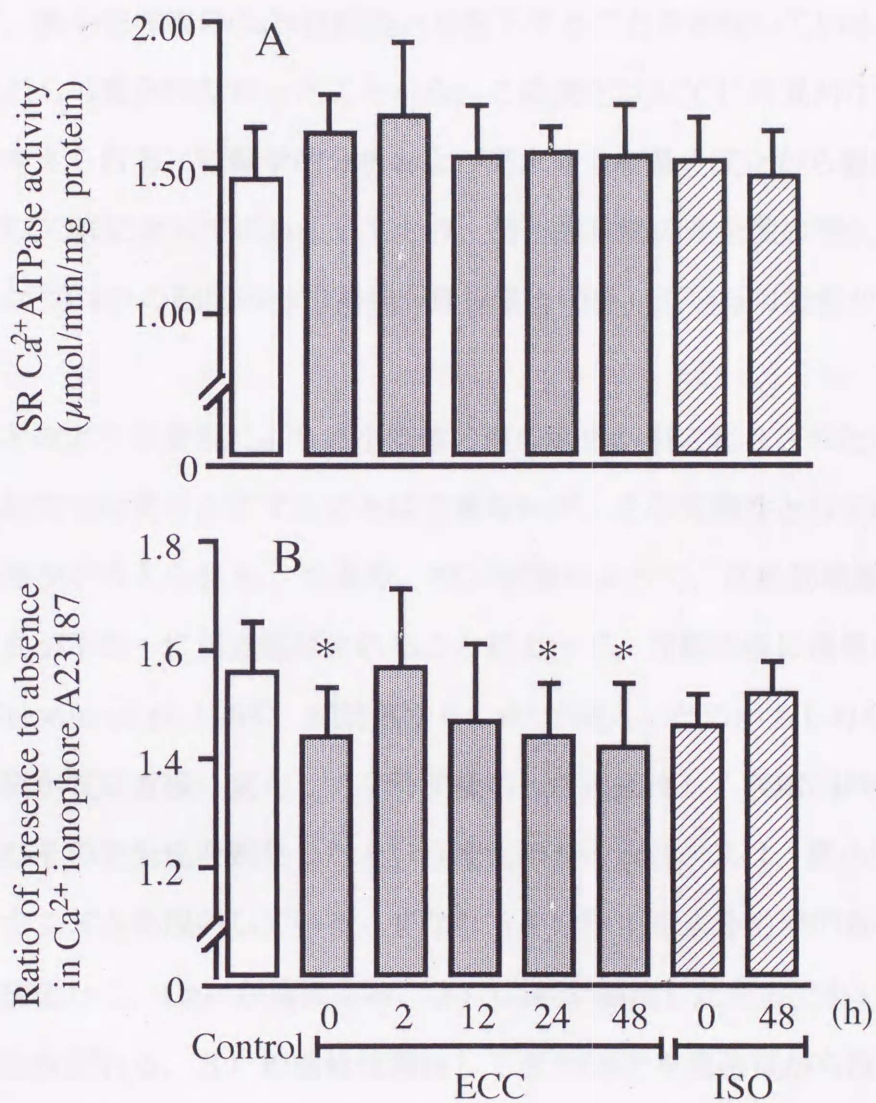


Fig. 11 Ca²⁺-ATPase activity in the presence of Ca²⁺ ionophore A23187 in reaction medium (A) and ratio of activity with presence and absence in A23187 from tibialis anterior muscle in control, isometric (ISO) and eccentric (ECC) contraction groups. Values are means \pm SD * P < 0.05 for Control vs. ISO and ECC.

4. 考察

本研究の結果はECC刺激により筋小胞体のCa²⁺取り込み能力は変化せず、筋小胞体膜のCa²⁺保持能力が低下することを示唆している。ISOでは、これらの変化はなかったことから、この変化はECCに特異的な変化であると考えられる。組織学的分析および筋水分含有量の変化から観察した筋損傷はECC群においてのみ生じており、筋小胞体膜の完全性の喪失、それにとりもなうCa²⁺の細胞内への漏洩が筋損傷と関係している可能性が示唆される。

どのような要因により筋小胞体の膜の変化が引き起こされたかについて、本研究では明らかにすることはできないが、その可能性として細胞内Ca²⁺の増加が考えられる。つまり、ECC刺激によって、活動筋線維のサルコメア長が不均一に引き延ばされることによって、筋線維膜に損傷が生じ (Colomo et al. 1988)、細胞外からCa²⁺が流入したのかもしれない。筋小胞体膜が収縮直後に変化して2時間後いったん回復し、収縮24時間以降ふたたびその完全性を喪失したという変化のタイムコースは、筋小胞体膜変化のメカニズムを説明している。すなわち1) ECCによる力学的負荷により膜が変化して、Ca²⁺が漏洩する。2) Ca²⁺が漏洩したままでもいったんは膜がふさがれる。3) 筋線維は漏洩してきたCa²⁺を細胞質から取り除こうとするが、その能力以上にCa²⁺が増加した筋線維はCa²⁺依存性のタンパク分解酵素あるいは膜のリン脂質分解酵素が活性化して、筋損傷を引き起こす。以上のような仮説を明らかにするためには、細胞内のCa²⁺濃度の測定を行って、より詳細に検討しなければならない。

5. 要約

エクセントリックな収縮によって引き起こした筋損傷時の筋小胞体の変化について検討した結果、以下の結論を得た。

1. アイソメトリックな収縮では組織学的な筋の異常は観察されないが、エクセントリックな収縮は48時間後に顕著な筋損傷を引き起こした。
2. エクセントリックな収縮刺激により Ca^{2+} -ATPase活性に変化はなかった。
3. エクセントリックな収縮刺激直後、および24, 48時間後において、 Ca^{2+} イオノフォアを加えた際、 Ca^{2+} -ATPase活性の増加の程度がコントロール群よりも少なく、筋小胞体の膜に変化が生じていることが示唆された。

以上の結果から、エクセントリックな収縮刺激を行うと、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力は低下しないが、筋小胞体の膜に変化が生じる可能性が示唆された。

V章. 一過性の高強度疲労困憊運動が筋小胞体の Ca²⁺調節能力に与える影響 (実験2)

1. 目的

実験1の結果, エクセントリックな筋活動は筋小胞体の膜に変化を与えるが, 筋小胞体Ca²⁺取り込み能力には変化を生じさせないことが明らかとなった. エクセントリックな筋活動により細胞内のCa²⁺濃度が増加し, これにより筋小胞体膜に変化が生じたことが考えられる. 実験2ではpHの低下やATPの低下が生じるであろう高強度疲労困憊運動後に, 筋小胞体膜やCa²⁺取り込み能力に変化が生じるかどうかについて検討することを目的とした. 高強度の運動では, 乳酸の蓄積にともないH⁺濃度が増加し, Ca²⁺-ATPaseのATP結合部位に変化を与える可能性が考えられることから, ATPの競合剤であるFITCを用いてATPの親和性について評価した. 遅筋線維では, このFITCを用いた測定は, Ca²⁺-ATPaseのATP結合部位そのものの変化であるのか, あるいは, 膜タンパクであるホスホランバンのリン酸化による二次的な親和性の変化が生じているのかを区別することができない. もしホスホランバンが関与しているのであればATPだけでなくCa²⁺に対しても親和性が変化するはずである. このことから, 遅筋線維であるヒラメ筋についてはCa²⁺とATPに対する親和性の変化をミカエリス定数を求めて評価した.

2. 方法

(1) 被検動物および運動プロトコール

実験にはWistar系雄ラット12匹を用いた。4週齢から小動物用トレッドミル装置（夏目製作所，KN-73）を使い，週2回，1日10分間の走行練習を行った。最初の週の走行練習は，傾斜0%，速度10 m/minとし，毎週少しずつ傾斜と速度を増加させ，最後の週は傾斜10%，速度20-30 m/minで10分+速度50 m/minで10秒間走行させた。この走行練習は，ラットがトレッドミルに慣れるために行ったもので，トレーニング効果を意図したものではない。ラットが10週齢になった時点で，ランダムにコントロール群6匹，高強度運動群6匹にグループ分けした。高強度運動群は，傾斜10%，速度50 m/minで疲労困憊に至るまで運動させた。この強度はラットの100% $\dot{V}O_{2max}$ 強度に相当する(Brooks & White 1978)。

(2) 被検筋および筋タンパクの抽出

被検筋にはヒラメ筋 (SOL)，外側広筋の表層部位 (VS) および深層部位 (VD) を用いた。これらの筋は運動の主働筋であり，また筋間で組成の異なるサンプルである。すなわち，SOL, VS, VDはそれぞれType I, Type IIB, Type IIA型の筋線維により主に構成されている (Ariano et al. 1973)。左脚の筋は筋の代謝産物測定用に，右脚の筋は筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性測定用に用いた。

(3) 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性の測定は，実験1と同様の方法を用いた。酵素活性は $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ で表した。高強度運動による筋小胞体膜の変化は，実

験 1 と同様インキュベーション溶液中に0.2 mg/mlのCa²⁺イオノフォア, A23187を10 μl 加え, イオノフォア存在下と非存在下でのCa²⁺-ATPase活性の比から評価した.

測定の際, 25, 50, 75, 100 μMのFITCをインキュベーション溶液に加え, それぞれの濃度でのCa²⁺-ATPase活性を測定した. そして, その活性値の傾きから最大活性を50%阻害するFITCの濃度を算出し, ATP結合部位に変化が生じるかどうかについて評価を行った.

Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性の評価は, ATPとCaCl₂の濃度の異なるインキュベーション溶液をそれぞれ5種類準備し, 各濃度で酵素活性を測定し, Lineweaver-Burkの式によりミカエリス定数(K_m)を求めることにより行った. インキュベーション溶液中の遊離Ca²⁺濃度の測定は, Ca²⁺蛍光指示薬Fura-2を用いて, Kargacin et al. (1988)の方法により測定した. 測定は, 蛍光光度計による(CAF-110, 日本分光) 2波長励起 (340 nm と380 nm) 1波長 (500 nm) 蛍光測定によるRatioモードで測定した. Ca²⁺-Fura-2 錯体の解離定数 (K_d) は 250 nM を用いた (Simonides & van Hardeveld 1990).

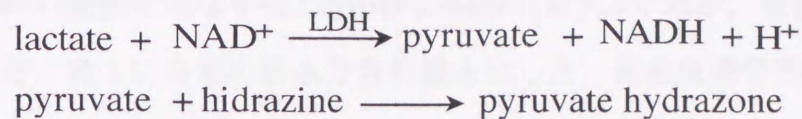
(4) 筋水分含有量

筋サンプルの一部は, 湿重量と凍結乾燥後に乾燥重量を測定し, その差を筋水分量として評価した.

(5) 筋中乳酸濃度

筋中乳酸濃度の測定は, Lowry & Passonneau (1972)の方法に従い, 以

下の反応式を用いて行った。



筋サンプルを、 -70°C で一晩凍結乾燥した後、結合組織を取り除き、液体窒素中でパウダーにした。筋重量を測定し、予め冷却した0.3 mlの2 N Perchloric acid中で20分間 (-10°C) 抽出した。2000 g で10分間遠心分離した後、上清を0.25 mlとり 2 M KClO_4 を加えて中和する。再び遠心分離した後、上清0.35 mlをとり、100 mM KHCO_3 (pH 7.5) を0.65ml加え、測定まで -80°C に保存した。インキュベーション溶液の組成は、100 mM hydradine, 100 mM 2-amino-methyl-1-propanol, 0.5 mM NAD, 8 U/ml LDH (pH 10.0) であった。インキュベーション溶液を2 mlとり、サンプルを20 μl , 250 U/ml LDHを66.8 μl (最終濃度8 U/ml) 加えた。暗所に60分間放置した後、蛍光値を分光蛍光光度計 (島津製作所, RF-5000) を用い、励起波長340 nm, 蛍光波長460 nmにて測定した。

(6) 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差で表した。コントロール群と運動群との比較は、対応のないStudentのt-testにより有意差を検定した。有意水準は5%とした。

3. 結果

(1) 運動時間および筋水分含有量

運動群の運動時間は平均2分48秒±44秒（最大3分58秒，最低2分10秒）であった。表1に各筋の筋水分含有量を示した。高強度疲労困憊運動によりSOLの筋水分含有量が有意に低下した。VSとVDにおいて運動群はコントロール群よりも有意に高い値を示した。

(2) 筋中乳酸濃度

図12にコントロール群と運動直後の高強度運動群の筋中乳酸濃度を示した。VSにおいて，運動群はコントロール群よりも有意に高い値（87.2%）を示した。SOLおよびVDでは，統計的に有意な変化は見られなかった。

(3) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

Ca²⁺イオノフォア存在下における筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性は，VSにおいて，高強度運動により有意な低下が観察された（図13-A）。コントロール群に対するその低下率は31.1%であった。全ての筋において，Ca²⁺イオノフォア存在下での筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性値は，イオノフォア非存在下よりも高く，平均でSOL 48%，VS 65%，VD 69%の高値が認められた。この増加率には運動による影響は観察されなかった（図13-B）。

(4) FITCによる筋小胞体Ca²⁺-ATPaseの評価

図14に筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性を50%阻害するのに必要なFITCの濃度を示した。SOLにおいて，高強度運動群がコントロール群と比較し有意に高い値を示した。しかしながら，VSおよびVDにおいては，各群間に有意な差は観察されなかった。

Table 1. Percent water of soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and deep (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and high intensity exercise (HE) groups.

		SOL	VS	VD
	n		%	
Control	5	77.1 ± 0.6	78.0 ± 1.4	75.7 ± 0.6
HE	6	75.3 ± 1.3 *	78.2 ± 0.7*	76.9 ± 0.6*

Values are means ± SD ; n, number of samples.

* P < 0.05 for Control vs. HE.

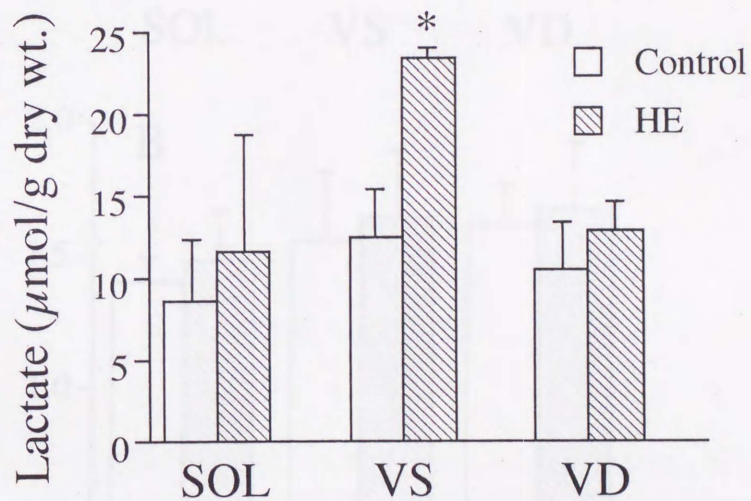


Fig. 12 Muscle lactate concentration of soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and profundus (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and high intensity exercise (HE) groups.

* $P < 0.05$ for Control vs. HE.

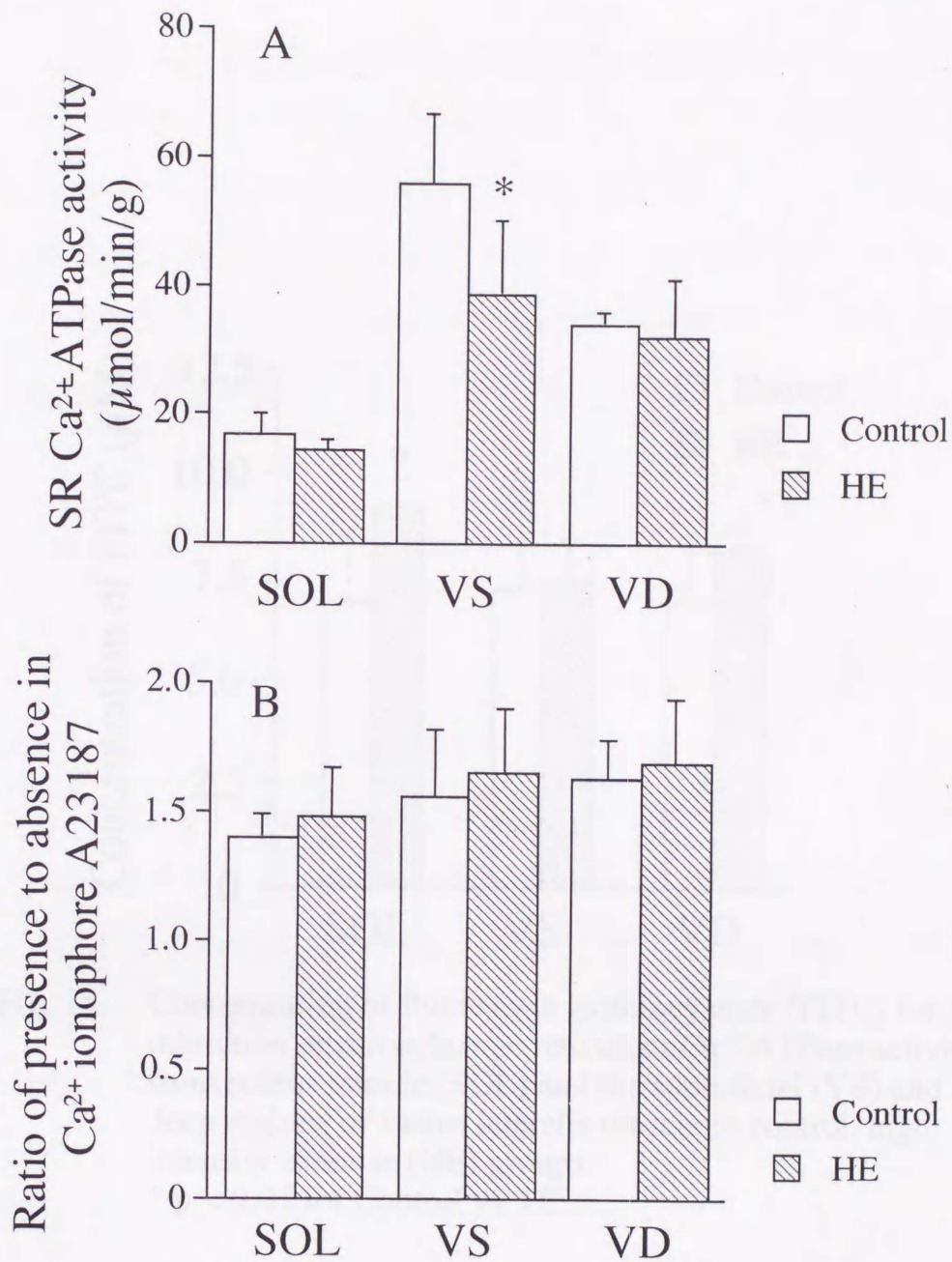


Fig. 13 Ca²⁺-ATPase activity in presence of Ca²⁺ ionophore A23187 in reaction medium (A) and ratio of activity with presence and absence in A23187 (B) from soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and deep (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and high intensity exercise (HE) groups. Values are means ± SD
* P < 0.05 for Control vs. HE.

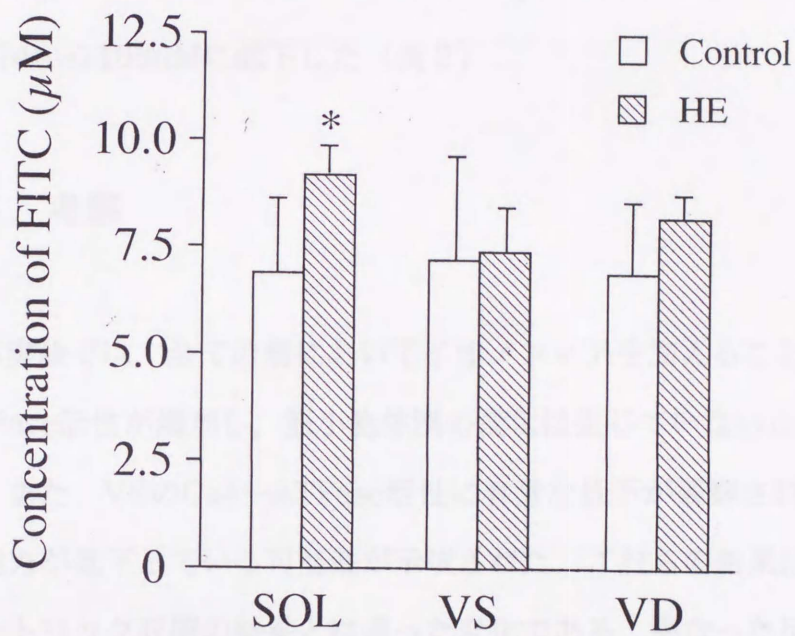


Fig. 14 Concentration of fluorescein isothiocyanate (FITC) for 50% inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity from soleus muscle (SOL) and the superficial (VS) and deep regions of vastus lateralis muscle in control, high intensity exercise (HE) groups.
 * $p < 0.05$ for Control vs. HE.

(5) Ca^{2+} -ATPaseのATP, Ca^{2+} に対する親和性の評価

SOLの筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseのATP, Ca^{2+} に対する親和性をLineweaver-Burkの逆数プロットにより求めた。コントロール群と高強度運動後の代表的なプロットを図15に示した。疲労困憊運動によりATPに対する K_m はコントロール群の219から147 μM に低下した。 Ca^{2+} に対する K_m は274から168nMに低下した(表2)。

4. 考察

本実験では、全ての筋においてイオノフォアを加えることにより、 Ca^{2+} -ATPase活性が増加し、筋小胞体膜の変化は生じていないことが示唆された。また、VSの Ca^{2+} -ATPase活性に有意な低下が観察され、 Ca^{2+} 取り込み能力が低下している可能性が示唆された。これらの結果は、実験1のエクセントリック収縮の結果とは違った変化である。異なった反応が観察された理由として、収縮形態の違いがあるかもしれない、すなわちラットの外側広筋は走行中エクセントリックよりもむしろコンセントリックな収縮活動を行っており、筋線維膜へのストレスが少なく、細胞外からの Ca^{2+} の流入がないため筋小胞体膜に対するダメージがなかったのであろう。

Ca^{2+} -ATPase活性が低下した理由として、この実験のような高強度運動の場合、高エネルギーリン酸の枯渇とpHの低下が関与していることが考えられる。高強度の運動を行うと、ATP濃度は安静値(5mM)よりもわずかに低下するが(3.4 mM)(Leberer et al. 1987)、 Ca^{2+} -ATPaseのATPに

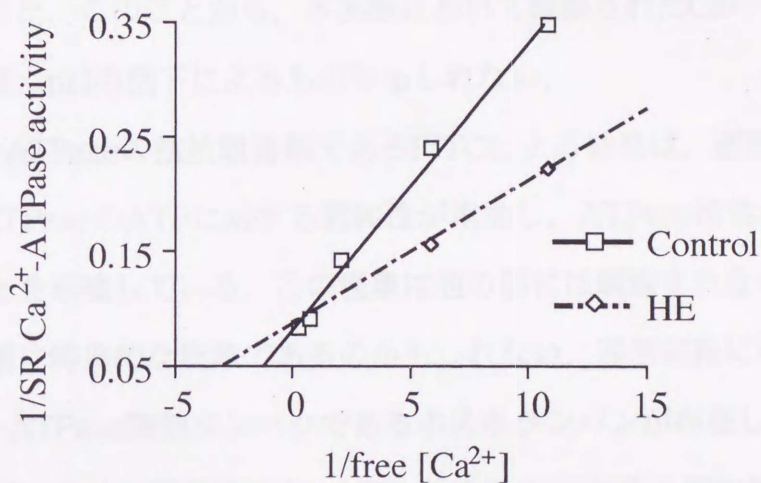
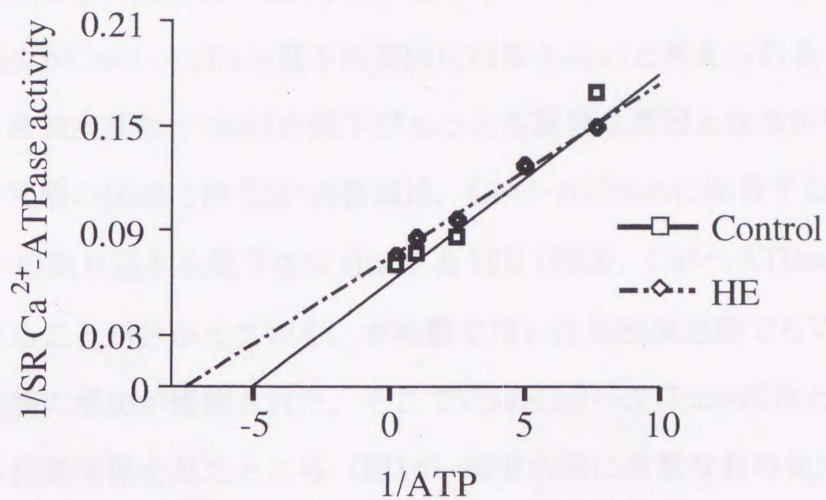


Fig. 15 Ca²⁺-ATPase activity expressed as a double reciprocal plot of activity vs. Ca²⁺ concentration for soleus muscle in control and high intensity exercise (HE) groups.

Table 2. Michaelis constant (Km) for ATP and free Ca²⁺ of soleus muscle in control and high (HE) intensity exercise groups.
* P < 0.05 for Control vs. HE.

	Control	HE
Km for ATP (μ M)	219 \pm 47	147 \pm 54 *
Km for free Ca ²⁺ (nM)	274 \pm 51	168 \pm 43 *

対するミカエリス定数は ($219\mu\text{M}$, 表2), それよりはるかに低いため, ATPの減少が Ca^{2+} -ATPase低下の要因にはならないと考えられる. したがって, 高強度運動ではpHの低下がもっとも重要な要因となるかもしれない. 筋中乳酸の増加に伴う H^+ の蓄積は, Ca^{2+} -ATPaseに結合する Ca^{2+} の量や Ca^{2+} の取り込みを低下させ (Inesi & Hill 1983), Ca^{2+} -ATPase活性を低下させることが分かっている. 本実験で用いた高強度運動でもVSに顕著な乳酸濃度の増加が観察された. そこでVSの Ca^{2+} -ATPase活性と筋中乳酸濃度との相関関係を見たところ (図16) 両者の間に有意な負の相関関係が認められた. このことから, 本実験において観察された Ca^{2+} -ATPase活性の低下は, pHの低下によるものかもしれない.

Ca^{2+} -ATPaseの拮抗阻害剤であるFITCによる結果は, 運動によりSOLの Ca^{2+} -ATPaseのATPに対する親和性が増加し, ATPase活性が刺激されていることを示唆している. この現象は他の筋には観察されなかったことから遅筋線維に特異的な現象であるのかもしれない. 遅筋線維には速筋線維にならぬ Ca^{2+} -ATPase調節タンパクであるホスホランバンが存在している. ホスホランバンのリン酸化は Ca^{2+} -ATPaseの Ca^{2+} に対する親和性を増加させることによって Ca^{2+} -ATPaseを刺激する. したがって, SOLにおいてATPと同時に Ca^{2+} に対する親和性も増加したことは (表2), 高強度の運動によって交感神経活動の亢進によりcAMP依存性プロテインキナーゼが活性化され, SOLのホスホランバンがリン酸化され, 酵素活性が刺激された可能性を強く支持している. このような親和性の増加は, 高強度疲労困憊運動後に筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性が低下するのを抑制しているのかもしれない.

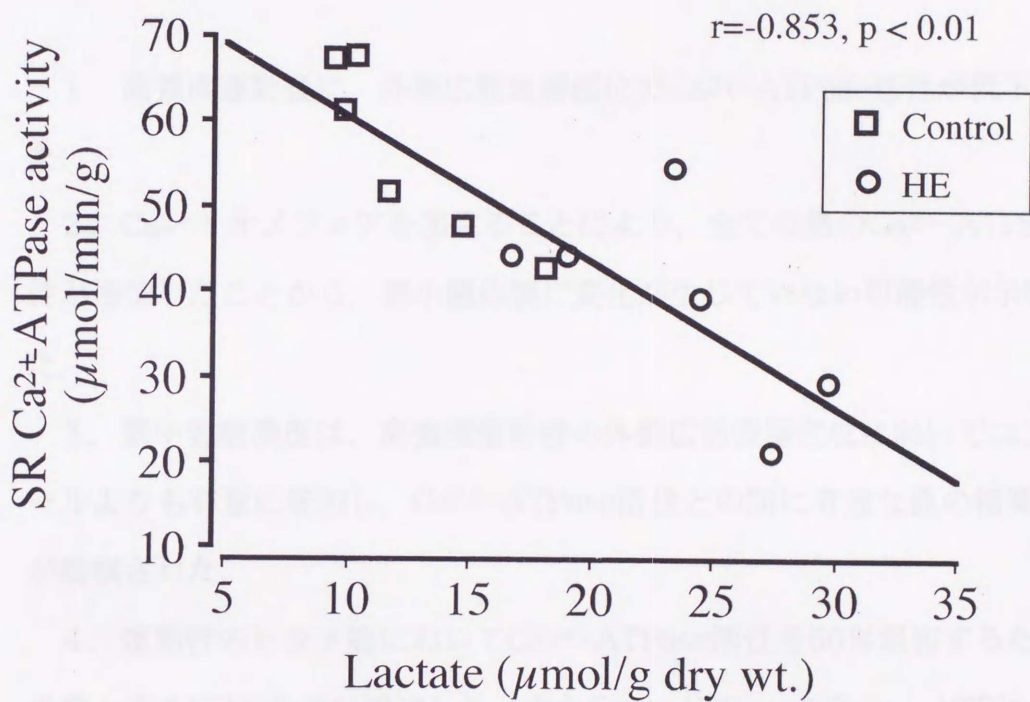


Fig. 16 Relationship between the Ca²⁺-ATPase activity in the presence of ionophore and muscle lactate concentration of the superficial regions of vastus lateralis muscle in control and high intensity exercise (HE) groups.

5. 要約

本研究は短時間で疲労困憊に至るような高強度の運動後に筋小胞体のCa²⁺取り込み能力や筋小胞体膜の特性が変化するか否か。また変化するのであればそれがどのような機序で起こっているのかについて検討し、以下の結論を得た。

1. 高強度運動後に、外側広筋表層部位のCa²⁺-ATPase活性が低下した。
2. Ca²⁺イオノフォアを加えることにより、全ての筋のCa²⁺-ATPase活性が増加したことから、筋小胞体膜に変化が生じていない可能性が示唆された。
3. 筋中乳酸濃度は、高強度運動群の外側広筋表層部位においてコントロールよりも有意に増加し、Ca²⁺-ATPase活性との間に有意な負の相関関係が観察された。
4. 運動群のヒラメ筋においてCa²⁺-ATPase活性を50%阻害するために必要とするFITCの量が増加した。またCa²⁺-ATPaseのCa²⁺、ATPに対する親和性も増加した。

以上の結果から、本研究において用いた高強度・短時間の運動では、Ca²⁺取り込み能力の低下が生じるが、筋小胞体膜に変化は生じないこと、このCa²⁺取り込み能力の低下に乳酸濃度の増加にともなうpHの低下が関与している可能性が示唆された。さらにヒラメ筋において、運動はCa²⁺-

ATPaseのATPに対する親和性をあげ、運動後のCa²⁺-ATPase活性の低下を阻止している可能性が示唆された。

Ca²⁺保持能力に与える影響 (実験3)

1. 目的

この実験は、運動後のCa²⁺保持能力に与える影響を調べることを目的とした。実験1において、長時間運動後に骨小胞体のCa²⁺-ATPase活性が低下すること、そしてこの低下が骨小胞体pHの増加と関係していることが明らかとなった。骨小胞体のpHとそれにともなうpHの低下は、長時間運動を行ったときに顕著に観察される現象であり、それが骨小胞体の運動で起こることは考えにくい。長時間の運動で骨小胞体pHの低下やCa²⁺-ATPase活性の低下が起る原因は、長時間運動による骨小胞体のCa²⁺保持能力が低下することである。そこで本実験は、長時間運動後に骨小胞体のCa²⁺保持能力がCa²⁺取り込み能力に変化が生じるかどうかについて、検討することを目的とした。具体的には、実験1で観察されたような、骨小胞体Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺やATPに対する親和性が変化するかどうかも合わせて検討した。

2. 方法

(1) 実験動物および実験プロトコール

実験にはWistar系雄ラットに使用した。オランダから小動物用ドレッシング用品店「東洋動物薬」(K9-7) を購入し、運来後、下着1週間の上野飼育

VI章. 一過性の低強度疲労困憊運動が筋小胞体の Ca²⁺調節能力に与える影響 (実験3)

1. 目的

実験2において、高強度・短時間運動後に筋小胞体のCa²⁺-ATPase活性が低下すること、そしてこの低下が筋中乳酸の増加と関係していることが明らかとなった。筋中乳酸の蓄積とそれともなうpHの低下は、高強度運動を行ったときに特徴的に観察される現象であり、それが低強度の運動で生じるとは考えにくい。低強度の運動では、筋グリコーゲンの枯渇や活性酸素の産生といった、高強度とは異なった細胞内代謝環境が、筋小胞体のCa²⁺調節能力に変化を与えると考えられる。そこで本実験は、低強度・長時間運動後に筋小胞体膜のCa²⁺保持能力やCa²⁺取り込み能力に変化が生じるかどうかについて、検討することを目的とした。さらに、実験2で観察されたような、筋小胞体Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺やATPに対する親和性が変化するかどうかも合わせて検討した。

2. 方法

(1) 被検動物および運動プロトコール

実験にはWistar系雄ラット12匹を用いた。4週齢から小動物用トレッドミル装置(夏目製作所, KN-73)を使い、週2回、1日10分間の走行練習

を行った。最初の週の走行練習は、傾斜0%、速度10 m/minとし、毎週少しずつ傾斜と速度を増加させ、最後の週は傾斜10%、速度25 m/minで週2回走行させた。この処置はラットをトレッドミルに慣れさせるためのもので、トレーニング効果を意図したものではない。ラットが10週齢になった時点で、ランダムにコントロール群6匹、低強度運動群6匹にグループ分けした。低強度運動群は、傾斜10%、速度25 m/minで疲労困憊に至るまで運動させた。この強度はラットの75% $\dot{V}O_2$ max強度に相当する(Brooks & White 1978)。

(2) 被検筋および筋タンパクの抽出

被検筋にはヒラメ筋 (SOL) , 外側広筋の表層部位 (VS) および深層部位 (VD) を用いた。

(3) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の測定は実験1, 2と同様である。

(4) 筋グリコーゲン含量

組織片の一部は筋グリコーゲン含量の測定に用いた。測定はPassonneau & Lauderdaleの方法 (1974)を用いて測定した。

(5) 統計処理

データは平均値±標準偏差で表した。コントロール群と運動群との比較は、対応のないStudentのt-testにより有意差を検定した。有意水準は5%

とした。

3. 結果

(1) 運動時間および筋水分含有量

疲労困憊に至るまでの平均運動時間は 89 ± 30 分（最大2時間5分，最低55分）であった。筋水分含有量に統計的な差は認められなかった。

(2) 筋グリコーゲン濃度

図17にコントロール群と運動群の筋グリコーゲン濃度を示した。疲労困憊運動後，3つの筋全てにおいて顕著なグリコーゲンの減少が観察された。SOL, VS, VD筋の低下率はそれぞれ，76.4%，75.7%，73.4%であった。このことは，3つの筋全てが運動によって同程度に動員されたことを示している。

(3) Ca^{2+} -ATPase活性

図18にコントロール群と長時間運動群の Ca^{2+} -ATPase活性およびイオノフォアの存在下と非存在下における Ca^{2+} -ATPase活性の比を示した。疲労困憊運動は測定した全て筋の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性を有意に低下させた。イオノフォアを加えると全ての筋の Ca^{2+} -ATPase活性が増加した。

(4) Ca^{2+} -ATPaseのATP, Ca^{2+} に対する親和性の評価

実験2と同様にLineweaver-Burkの逆数プロットを使って，筋小胞体

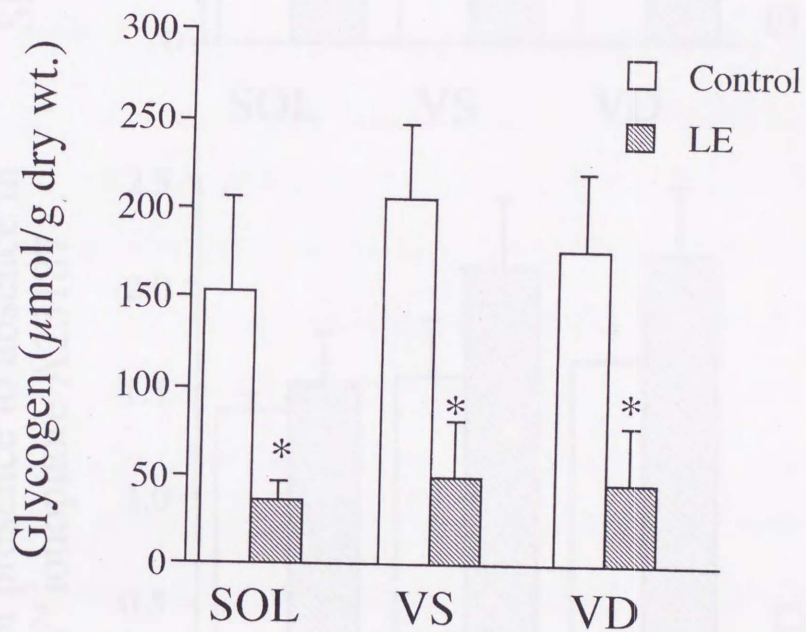


Fig. 17 Muscle glycogen concentration of soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and deep (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and low intensity exercise (LE) groups.
 * $P < 0.05$ for Control vs. LE

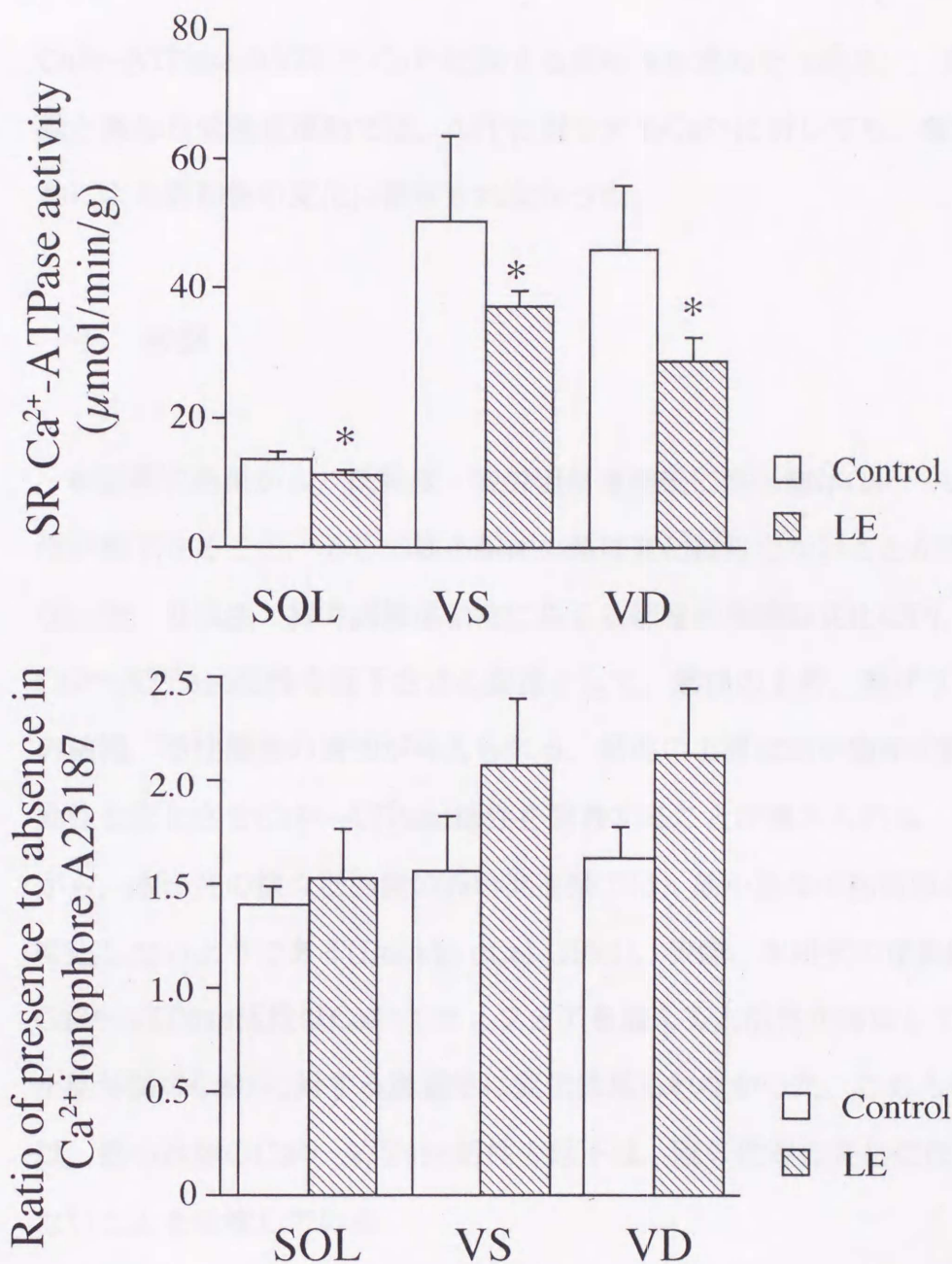


Fig. 18 Ca²⁺-ATPase activity in presence of Ca²⁺ ionophore A23187 in reaction medium and ratio of activity with presence and absence in A23187 from soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and deep (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and low intensity exercise (LE) groups. Values are means \pm SD * P < 0.05 for Control vs. LE.

Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性を求めた(表3)。高強度の運動と異なり低強度運動では、ATPに対してもCa²⁺に対しても、疲労困憊運動による親和性の変化は観察されなかった。

4. 考察

本研究の結果から、低強度・疲労困憊運動後に筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性が低下すること、そして筋小胞体の膜に変化は生じないことが明らかとなった。低強度・疲労困憊運動時に生じる細胞内環境の変化の内、Ca²⁺-ATPase活性を低下させる要因として、筋温の上昇、筋グリコーゲンの枯渇、活性酸素の増加が考えられる。筋温の上昇は筋小胞体の脂質膜の流動性を変化させCa²⁺-ATPase活性を阻害することが考えられる。しかしながら、本研究の様な低強度の長時間運動では、筋小胞体の脂質膜の流動性は変化しないようである(Luckin et al. 1991)。実際、本研究の運動群のCa²⁺-ATPase活性はCa²⁺イオノフォアを加えると活性が増加しており、筋小胞体膜のCa²⁺に対する透過性に変化は見られなかった。これらのことは、筋小胞体のCa²⁺-ATPase活性の低下は、膜の性質の変化に依存していないことを示唆している。

糖代謝に関係する酵素(ホスホリラーゼキナーゼ、ホスホリラーゼホスファターゼ)活性の変化はCa²⁺-ATPase活性に影響を与えることから、筋グリコーゲンの枯渇による糖代謝の変化もまた、Ca²⁺-ATPase活性を低下させているかもしれない。本研究において疲労困憊運動時に筋グリコーゲンは枯渇こそしていないものの、著しく低下しており、筋内における糖代謝の

Table 3. Michaelis constant (Km) for ATP and free Ca²⁺ of soleus muscle (SOL), and the superficial (VS) and deep (VD) regions of vastus lateralis muscle in control and low intensity exercise (LE) groups.

Group	Km for ATP (μ M)			Km for free Ca ²⁺ (nM)		
	SOL	VS	VD	SOL	VS	VD
Control	219 \pm 47	102 \pm 56	194 \pm 23	706 \pm 161	1143 \pm 1390	1470 \pm 973
LE	303 \pm 102	187 \pm 58	138 \pm 46	471 \pm 198	1371 \pm 1139	929 \pm 368

影響が生じているのかもしれない。

筋活動にともなうミトコンドリア呼吸の亢進は、筋細胞内の活性酸素を増加させることが知られている(Reid 1992, Radák et al. 1995)。活性酸素の増加はタンパクの酸化や脂質の過酸化を引き起こし細胞の機能を低下させる(Sjödín 1990)。Scherer & Deamer (1986)が指摘したように、長時間にわたる運動によって細胞内に活性酸素が発生し、 Ca^{2+} -ATPaseタンパクのSH基が酸化された結果、酵素活性が低下した可能性も考えられる。しかしながら、本研究では活性酸素の影響についての測定を行っていないため、これらの可能性について明確に言及することはできない。

5. 要約

本研究は、低強度長時間の疲労困憊運動が筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力と筋小胞体の筋小胞体膜に与える影響について検討し、以下の結論を得た。

1. 低強度の疲労困憊運動後ヒラメ筋と外側広筋の表層部位・深層部位の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase活性が低下した。
2. Ca^{2+} イオノフォアを加えることにより、全ての筋において Ca^{2+} -ATPase活性の増加が認められ、筋小胞体膜には変化が生じていない可能性が示唆された。
3. Ca^{2+} -ATPaseのATPと Ca^{2+} に対する親和性に変化はなかった。

以上の結果から、低強度・長時間の疲労困憊運動においても筋小胞体の膜

に損傷は生じないことが示唆された。また疲労困憊運動により、筋小胞体 Ca^{2+} 取り込み能力は低下するが、高強度の運動と異なり ATP と Ca^{2+} に対する親和性は変化しないことが明らかとなった。

1. 目的

骨格筋はそのとりよく運動に適応して変化する能力を持っている。例えば、持久性トレーニングは筋繊維のミオシン濃度の増加やミトコンドリアの濃度の増加、それによっても筋線粒体の酸化能力を増加させること（Gollnick, 1972）。

一時的なトレーニングが筋小胞体の組成を高める影響についての研究は少ない。また一時的な結果が報告されていない。初期の研究ではラットに対する持久性トレーニング後に Ca^{2+} -ATPase 活性や Ca^{2+} 取り込み能力が低下していることが報告されている (Snyder et al., 1976)。一方、Kim et al. (1981) はラットにトレーニングを行なった結果、骨格筋の筋線粒体において Ca^{2+} 取り込み能力が低下することを報告している。このようにトレーニングに対する筋小胞体の変化が明らかになっていないことに加え、一時的な運動後の筋小胞体の変化に対するトレーニングの影響について検討した研究はない。

そこで、本研究は持久性トレーニングにより筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 活性が変化するかどうか、検討することを目的とした。さらに、実験1, 2で見られたような一時的な運動後の Ca^{2+} -ATPase 活性の低下に対するトレーニングの影響についても検討を加えた。

2. 方法

VII章. 持久性トレーニングによる筋小胞体 Ca²⁺-ATPase活性の変化 (実験4)

1. 目的

骨格筋はそのとりまく環境に適応して変化する能力を持っている。例えば、持久性トレーニングは遅筋型のみオシン重鎖の割合の増加やミトコンドリアの数と量の増加、それにもなう有酸素系酵素活性の増加を引き起こす (Gollnick 1986)。

持久性トレーニングが筋小胞体の機能に与える影響についての研究は少なく、また一致した結果が得られていない。初期の研究ではラットに対する持久性トレーニング後にCa²⁺-ATPase活性やCa²⁺取り込みに変化がないことが報告されている (Bonner et al. 1976)。一方、Kim et al. (1981) はラットにトレーニングを行わせた結果、外側広筋表層部位においてのみCa²⁺取り込み能力が低下することを報告している。このようにトレーニングに対する筋小胞体の変化が明らかになっていないことに加え、一過性の運動後の筋小胞体の変化に対するトレーニングの効果について検討した研究はない。

そこで、本研究は持久性トレーニングにより筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性が変化するかどうか、検討することを目的とした。さらに、実験1, 2で見られたような一過性の激運動後のCa²⁺-ATPase活性の低下に対するトレーニングの影響についても検討を加えた。

2. 方法

(1) 被検動物および運動プロトコール

実験にはWistar系雄ラット45匹を用いた。5週齢のラットをランダムに非トレーニング群 (n = 23) と持久性トレーニング (n = 22) 群に分け、トレーニング群は実験 2, 3 と同様のトレッドミル装置により10週間の持久性トレーニングを行った。トレーニングプログラムは第1週を10 m/min, 傾斜0%で10分間, 週5日間のランニングから開始し, 第3週の終わりまでに25 m/min, 傾斜10%で1時間, 週5日間の強度まで徐々に増加させ, その後はこの強度を維持した。10週間のトレーニング終了後, 非トレーニング群とトレーニング群はさらに安静群と一過性の運動群にそれぞれ分けた。トレーニング群の運動群は最後のトレーニングが終了して48時間後に, 非トレーニング群の運動群もトレーニング群と同時期に, 25 m/min, 傾斜10%の強度で1時間の運動, あるいは疲労困憊まで運動を行い, 運動直後に筋を摘出した。被検筋には, 低強度の運動時に主働筋となるヒラメ筋 (SOL) と外側広筋深層部位 (VD) を用いた。疲労困憊までの時間は, 非トレーニング群が106 ± 33分, トレーニング群が230 ± 90分であった。

(2) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の測定は実験 1-3 と同様の方法で行った。実験 3 の結果から, 低強度運動では筋小胞体膜に変化は生じないことが明らかとなったので, 本実験ではイオノフォアによる筋小胞体膜の評価は行わなかった。

(3) クエン酸合成酵素 (CS) 活性

トレーニング効果の検証のため、CS活性をSrere (1969)の方法により測定した。組織片を抽出液 (175 mM KCl, 10 mM glutathione, 2 mM EDTA)で50倍に希釈しホモジナイズした。測定溶液 (60 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 mM acetyl CoA, 0.1 mM DTNB, 0.5 mM oxaloacetate)にホモジナイズ溶液を加え反応させ、分光光度計で412 nmの波長の吸光度の変化を記録し、CS活性を求めた。

(4) ミオシン重鎖分子種

ミオシン重鎖 (MHC) 分子種の分離にはDoucet & Trifaro (1988) の方法を修正したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法を用いた。凍結乾燥した筋をパウダー状にした後、ガラスホモジナイザーを用い、約20 mgの筋を40 倍の抽出液 (5 M 尿素, 2 M チオ尿素, 10 mM ピロリン酸ナトリウム, 0.1% (vol./vol.) β -メルカプトエタノール) でホモジネートした。このホモジネートを62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (mass/vol.) SDS, 10% (vol./vol.) グリセロール, 5% (vol./vol.) β -メルカプトエタノール, 0.02% (mass/vol.) ブロモフェノールブルーを含む溶液にて75倍に希釈した。濃縮ゲルの組成は3% (mass/vol.) アクリルアミド, 0.08% (mass/vol.) ビスアクリルアミド, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.2% (mass/vol.) SDS, 0.1% (vol./vol.) TEMED, 0.1% (mass/vol.) 過硫酸アンモニウムである。分離ゲルの組成は6.8% (mass/vol.) ポリアクリルアミド, 0.18% (mass/vol.) ビスアクリルアミド, 200 mM Tris-100 mM グリシン (pH 8.6), 0.4% (mass/vol.) SDS, 30% (vol./vol.) グリセロール, 0.1% (vol./vol.) TEMED, 0.05% (mass/vol.) 過硫酸アンモニウムである。150 Vで40時間泳動した後、ゲルを銀染色した。得られたゲルをスキャナーでコンピュータに取り込みNIH Imageを用いてアイソフォームの分析を行った。

(5) 統計処理

統計量は平均値±標準偏差で示した。筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の比較は一元配置の分散分析により有意なF値が得られたとき、多重比較検定をSheffé法により行った。有意水準は5%とした。

3. 結果

(1) CS活性およびミオシン重鎖アイソフォーム

10週間の持久性トレーニングによりSOL, VDともにCS活性の増加が観察された。トレーニングしていない筋と比較してその増加率はSOLで9%, VDで33%であった(図19)。

SOLはMHCIとMHCIIAの二種類のMHCが認められ、その中でもMHCIの割合が高い。持久性トレーニングはMHCIの有意な増加とそれにとまなうMHCIIAの減少を引き起こした。VDは主に速筋型のMHCを含んでおり(MHCIIA, 27.4±5.9%; MHCIIID, 36.5±5.9%; MHCIIIB, 25.7±6.6%) MHCIの割合は少ない(10.4±6.6%)。持久性トレーニングによりMHCIIIBの割合は18.2±9.5%に減少しMHCIIAの割合が34.0±7.0%に増加した。MHCIはトレーニングによる変化は認められなかった(表4)。

(2) 筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性

持久性トレーニングがCa²⁺-ATPase活性に与える影響を検討するために、トレーニング群と非トレーニング群のそれぞれの安静群を比較した(図20)。

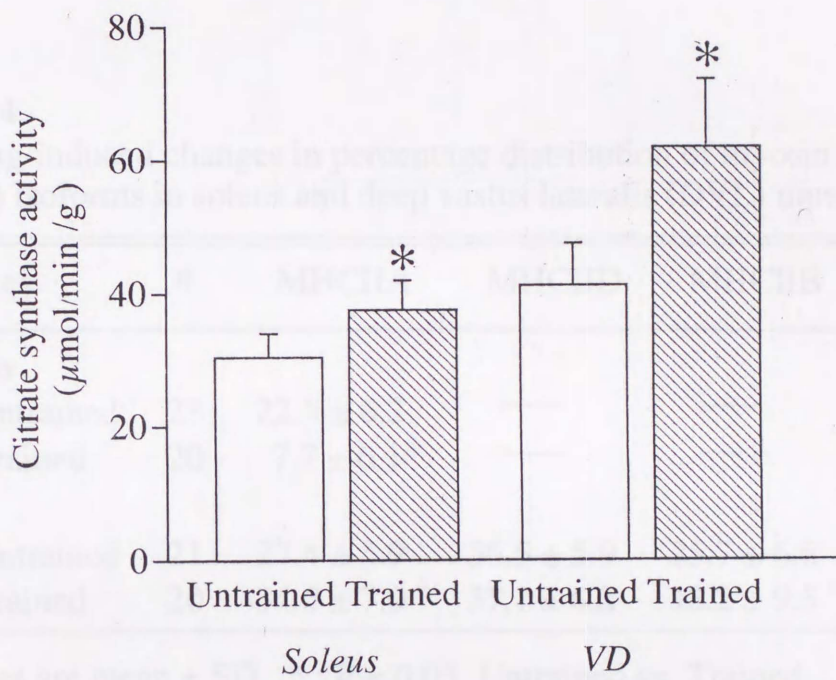


Fig. 19 Citrate synthase activity from soleus muscle and the deep regions of vastus lateralis muscle (VD) in control and endurance training groups.
 * $p < 0.05$ for Control vs. Training group.

Table 4

Training-induced changes in percentage distribution of myosin heavy-chain (MHC) isoforms in soleus and deep vastus lateralis (DVL) muscle.

Muscles	<i>n</i>	MHCIIA	MHCIID	MHCIIB	MHCI
Soleus					
Untrained	23	22.5 ± 6.2	—	—	77.5 ± 6.2
Trained	20	7.7 ± 6.1*	—	—	92.3 ± 6.1*
DVL					
Untrained	21	27.4 ± 5.9	36.5 ± 5.9	25.7 ± 6.6	10.4 ± 6.6
Trained	20	34.0 ± 7.0*	37.1 ± 6.2	18.2 ± 9.5*	10.7 ± 7.8

Values are mean ± SD. * : P < 0.05, Untrained vs. Trained.

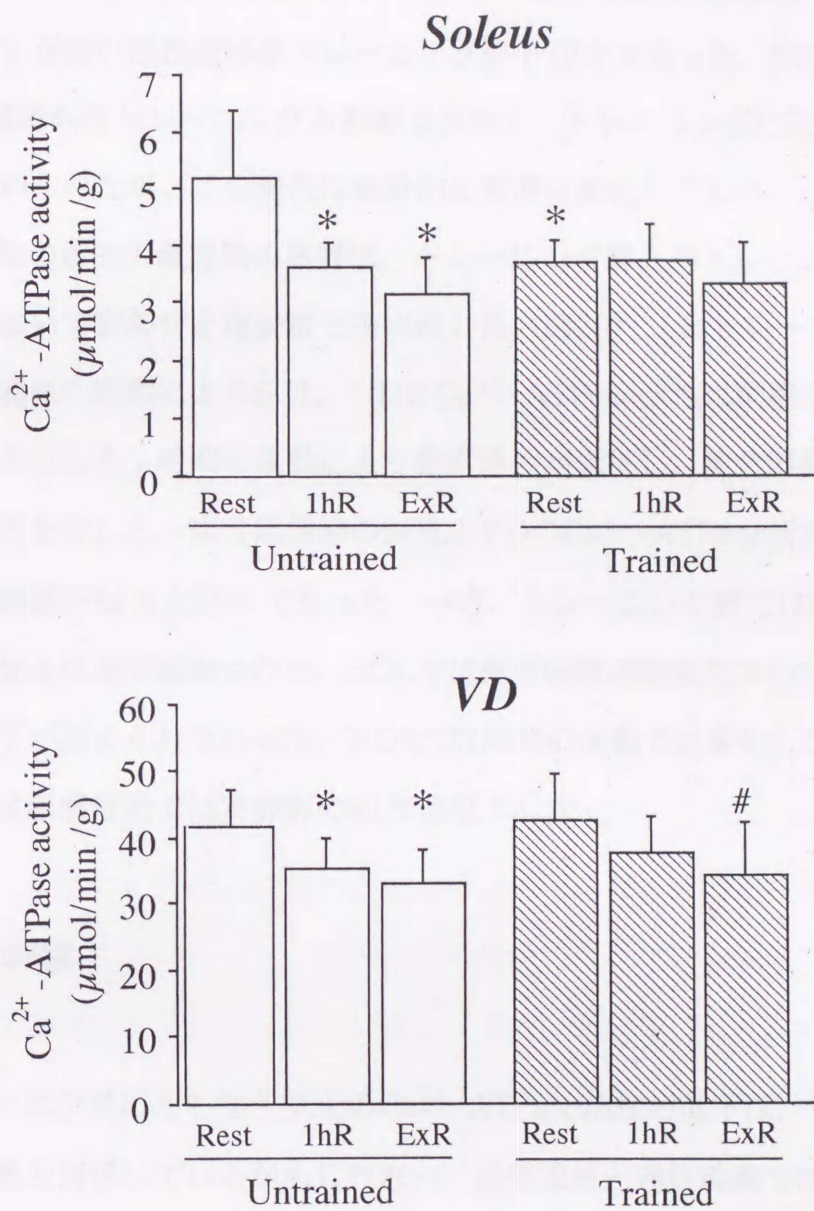


Fig. 20 Ca^{2+} -ATPase activity from soleus muscle (SOL) and the deep regions of vastus lateralis muscle (VD) in untrained (open bar) and trained (hatched bar) groups. Both untrained and trained animals were assigned to non-exercised (Rest) or exercised groups. The rats of exercised groups were run at 25m/min, and 10% grade for 1 h (1hR) or to exhaustion (ExR).
 * $P < 0.05$ for untrained non-exercised animals.
 # $P < 0.05$ for trained non-exercised animals.

持久性トレーニングはSOLのCa²⁺-ATPase活性を有意に減少させた。トレーニング群の活性値は非トレーニング群の73%であった。SOLと比較しVDでは持久性トレーニングの影響は少なく、トレーニングにより14%の減少が認められたが、この変化は統計的に有意な変化ではない。

一過性の疲労困憊運動の影響は、トレーニング群と非トレーニング群それぞれにおいて安静群と運動群とを比較した(図20)。非トレーニング群では、一過性の運動によりSOL、VDのCa²⁺-ATPase活性は同様な変化を示した。すなわち1時間の運動により酵素活性が低下し、疲労困憊時にはさらなる低下を示した。疲労困憊時のSOLとVDのCa²⁺-ATPase活性はそれぞれの安静群の61%と73%であった。一方、トレーニング群ではSOLとVDでは、異なる反応が観察された。SOLでは疲労困憊運動後においても酵素活性の低下が認められなかった。VDでは1時間の運動では変化しなかったが、疲労困憊運動では安静群の81%に低下した

4. 考察

トレーニングにともなうSOLのCa²⁺-ATPase活性の低下は、筋線維タイプの変換と関係しているかもしれない。速筋線維と遅筋線維ではCa²⁺-ATPaseのアイソフォームや筋小胞体膜に占めるタンパクの量が異なり、速筋線維の筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性は遅筋線維のそれより数倍高い(Dux 1993)。慢性的電気刺激により速筋線維(前脛骨筋)の活動量を増加させると、遅筋型のCa²⁺-ATPaseアイソフォームが増加してそれに付随して速筋型のCa²⁺-ATPaseアイソフォームが減少する。これらの変化はMHCアイソ

フォームの速筋型から遅筋型の変化と平行に変化する (Hämäläinen & Pette 1997). したがって, 表3に示したように持久性トレーニングにより SOLのミオシン重鎖が速筋型から遅筋型へ変換したことは, Ca^{2+} -ATPaseのアイソフォームも遅筋型に変換し, 酵素活性が低下したことを示唆している. VDの場合, ミオシン重鎖の変化はIIBからIIAであり速筋型の筋線維間の変化である. Ca^{2+} -ATPaseは速筋型では活性値の差異はないので, Ca^{2+} -ATPase活性は変化しなかったものと思われる.

激運動後の Ca^{2+} -ATPase活性の低下が, トレーニングにより抑制されたという本研究の結果は, これまでに報告されておらず, 興味深い結果である. このような現象が生じた理由として, 実験2で観察されたような, Ca^{2+} ポンプの調節タンパクであるホスホランバンのリン酸化が生じて, Ca^{2+} -ATPase活性の低下を抑制した可能性が考えられる. しかしながら, 本研究の実験3において, 長時間の運動後では Ca^{2+} -ATPaseのATPや Ca^{2+} に対する親和性に変化は起きていないので, この可能性はありそうにない. 他に考えられる理由として, 筋小胞体の機能低下が生じる前に, 筋グリコーゲンの枯渇や低血糖といった他の要因により疲労困憊に至った可能性がある. 筋小胞体は細胞内の環境変化に応じ極めて変動しやすい性質を持っていることから(和田と土持 1996), トレーニングの早い段階において長時間の運動に対して低下しにくい性質を身につけてしまい, 他の要因が筋収縮の制限因子になったのかもしれない. しかしながら, これらの可能性について, 本研究の結果からは明らかにすることはできないため, その可能性を探るためには, より詳細な測定が必要になるだろう.

5. 要約

持久性トレーニングが筋小胞体のCa²⁺-ATPase活性に与える影響について調べた結果、以下の結論を得た。

1. 持久性トレーニングによりヒラメ筋のCa²⁺-ATPase活性が低下した。外側広筋深層部位では、統計的に有意な変化は観察されなかった。
2. トレーニング群のヒラメ筋では一過性の運動によるCa²⁺-ATPase活性の低下が抑制された。
3. 外側広筋深層部位では、非トレーニング群は運動1時間後からCa²⁺-ATPase活性が低下したが、トレーニング群では疲労困憊時にのみCa²⁺-ATPase活性の低下が観察された。

以上の結果から、トレーニングによる筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の変化は筋により異なることが明らかとなった。さらに、疲労困憊に至るような運動時、トレーニングした条件でのヒラメ筋のような遅筋型の筋線維は、筋小胞体Ca²⁺取り込み能力の低下が筋疲労の要因にならない可能性が示唆された。

VIII章. 討論

Ca²⁺はあらゆる細胞における情報伝達系で普遍的なシグナル物質として働いている。骨格筋においてもCa²⁺は筋収縮のトリガーとしての重要な役割を果たしているが、その他にエネルギー代謝に関与する酵素の活性調節を行っていたり、筋線維タイプの決定に関係する (Chin et al. 1998) など様々な筋特異的生理反応に関与している。したがって細胞内のCa²⁺の変化は、単に収縮力を変化させるだけでなく、筋の代謝能力の変化や筋線維タイプの移行に関係し、筋の総合的なパフォーマンスを決定していると言っても過言ではない。身体活動が骨格筋の収縮を原動力として達成されることを考えると、細胞内のCa²⁺調節能力を研究することは、体育科学の研究として有効なアプローチであると考えられる。

Ca²⁺が細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能するために、また、細胞内のCa²⁺濃度が恒常的に増加すると細胞の破壊を引き起こすことから、通常細胞内のCa²⁺濃度は極めて低く維持しておく必要がある。骨格筋においてその主要な役割を果たすのが、筋小胞体である。筋小胞体のCa²⁺調節能力には3つの機能がある。それはCa²⁺取り込み能力、Ca²⁺保持能力、Ca²⁺放出能力である。Ca²⁺取り込み能力は筋小胞体の膜上に存在するCa²⁺-ATPaseがATPを消費してCa²⁺を筋小胞体内腔に取り込む能力である。Ca²⁺保持能力は取り込んだCa²⁺を筋小胞体内腔に保持したまま、外に漏らさないための能力であり、筋小胞体膜の性質に強く依存する。Ca²⁺放出能力は、Ca²⁺チャネルタンパク質 (リアノジン受容体) の性質により決定される。本研究ではこの3つの能力のうちCa²⁺取り込み能力とCa²⁺保持

能力について、様々な収縮活動後の変化について検討した。なぜなら、この2つの能力こそが、細胞内の Ca^{2+} 恒常性の維持に大きく関与する能力であるからである。

筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力は、周りの環境条件によって極めて変化しやすい性質を持っていることがin vitroの研究で明らかにされている。その条件とは Ca^{2+} 濃度、pH、ATP濃度、グリコーゲンの枯渇、活性酸素種の増加などである。このような変化は実際の運動中でも細胞内で生じる変化であるが、実際の運動刺激によって筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力が変化するのかわか、またその変化が Ca^{2+} の取り込み能力に起きるのか、筋小胞体の膜に生じるのかといった点については明らかになっていない。そこで本研究は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し損傷が生じると考えられる、エクセントリックな筋収縮刺激（実験1）、ATP濃度やpHの低下が生じるであろう、高強度疲労困憊運動（実験2）、筋グリコーゲンの枯渇が生じると考えられる低強度疲労困憊運動（実験3）を行い、それぞれの運動後の筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能力と筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力について検討を行った。その結果、エクセントリック収縮刺激では運動刺激直後と24~48時間後に筋小胞体膜の変化が観察され、 Ca^{2+} -ATPase活性で評価した Ca^{2+} 取り込み能力には変化が見られなかった。このことからエクセントリックな筋収縮は細胞外あるいは筋小胞体から Ca^{2+} が細胞内に流入し、その結果筋小胞体膜の Ca^{2+} 保持能力が低下したと考えられる。一方、疲労困憊運動では、高強度運動、低強度運動ともに、筋小胞体の膜には変化が見られなかったが、 Ca^{2+} 取り込み能力の低下が観察された。運動強度が異なれば運動に関与する筋やその動員様式も変化し、細胞内代謝環境も全く異なるものになるので、疲労困憊運動後の Ca^{2+} 取り込み能力の低下を引き起こすメカニズムも両強度で異なるもの

になるだろう。高強度の運動では、筋中乳酸が増加し、この濃度と Ca^{2+} -ATPase活性との間に有意な負の相関関係が観察されたことから、乳酸の蓄積にともなうpHの低下が Ca^{2+} -ATPase活性に影響を与えている可能性が示唆された。低強度の運動では、筋グリコーゲンの顕著な低下が観察されており、グリコーゲンの枯渇あるいはそれにともなうグリコーゲン分解に関係する酵素の変化と Ca^{2+} -ATPase活性が関係していることが考えられるが、詳細なメカニズムは本研究から明らかにすることはできない。高強度運動群のヒラメ筋において Ca^{2+} やATPに対する K_m の変化が観察され、親和性の増加が観察されたのに対し、低強度運動ではこの変化が見られなかった。この結果は筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力に対する運動の影響は強度の違いによって、全く異なるものになることを支持している。以上の結果から、筋に対する刺激が異なると筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力への影響も異なり、それは筋小胞体の膜であったり Ca^{2+} 取り込み能力に別々に影響することが明らかとなった。

筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力の低下は、筋の Ca^{2+} 恒常性を乱し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させることが予想される。このことは細胞の生理機能維持に不都合なことと考えられるが、同時に骨格筋の適応を生じさせるシグナルとなっている可能性もある。例えば、遅筋線維の細胞内 Ca^{2+} は速筋線維のそれよりも高く、この濃度の違いが筋線維タイプの決定に関係していると言われている (Chin et al. 1998)。したがって一過性の運動後の筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力の低下は、筋の機能を低下させるだけでなく、より運動に適した細胞に変化するための適応であるのかもしれない。もしこれが適応現象であるのなら、運動の繰り返しであるトレーニングを行えば、筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力も適応し変化するかもしれない。そこで、実験4において持久性トレ

ニングを行い、 Ca^{2+} 取り込み能力と一過性の運動後の Ca^{2+} 取り込み能力の変化に対するトレーニングの影響について検討した。その結果、トレーニングはヒラメ筋の Ca^{2+} -ATPase活性を低下させ、ミオシン重鎖のIIAからIへの変化を引き起こした。本研究は細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定していないけれども、 Ca^{2+} -ATPase活性の低下により細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した可能性は十分考えられる。そしてこの変化がミオシンアイソフォームの変化を引き起こし、より疲労しにくい筋への適応を引き起こすシグナルになっているのかもしれない。また、実験4から、疲労困憊運動後の Ca^{2+} -ATPase活性の低下が、トレーニングにより抑制されるという、興味深い結果も示された。なぜ Ca^{2+} -ATPase活性が低下しなくなったのか、その原因について本研究から明らかにすることはできない。推測の範囲で考察すると、トレーニングしたヒラメ筋はほとんど遅筋型の筋線維に移行し、適応の限界に達してしまったのかもしれない。これ以上の Ca^{2+} -ATPase活性の低下は細胞内の Ca^{2+} を過度に増加してしまい、セカンドメッセンジャーとしての Ca^{2+} の役割を果たせなくなるばかりか、細胞死を引き起こしてしまうために激しい運動後においても Ca^{2+} -ATPase活性が低下しなくなったということが推察される。このような機序が実際に作用しているのならば、外側広筋深層部位においても、もっと長い期間あるいは高い強度でのトレーニングを続けると疲労困憊運動後の Ca^{2+} -ATPase活性の低下が抑制されるであろう。この仮説を明らかにするためには、 Ca^{2+} -ATPase活性低下のメカニズムを解明する詳細な実験が必要であると考えられる。

IX章. 総括

本研究は、筋小胞体のCa²⁺調節能力を変化させると考えられる様々な筋収縮刺激を行ったときに、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力と筋小胞体膜のCa²⁺保持能力に変化が生じるかどうかについて検討することを目的とした。さらに、持久性トレーニングによって筋線維組成が変化したときの筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の変化を観察することを目的とし、以下の実験を行った。

実験1 エクセントリックな筋収縮活動後の筋小胞体の変化

細胞内Ca²⁺が増加し筋損傷が生じると考えられるエクセントリック収縮により、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力あるいは筋小胞体膜に変化が生じるかどうかについて検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. エクセントリックな筋収縮刺激の48時間後に顕著な筋損傷が観察された。
2. エクセントリックな筋収縮刺激後、Ca²⁺-ATPase活性に変化はなかった。
3. エクセントリックな筋収縮刺激の直後、および24、48時間後において、Ca²⁺イオノフォアを加えることによりCa²⁺-ATPase活性の増加が抑制され、筋小胞体の膜に変化が観察された。

以上の結果から、エクセントリックな筋収縮を行うと、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力は低下しないが、筋小胞体のCa²⁺保持能力が低下する可能性が示唆された。

実験2 一過性の高強度疲労困憊運動が筋小胞体のCa²⁺調節能力に与える影響

高強度の疲労困憊運動後に、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力あるいは筋小胞体膜のCa²⁺保持能力に変化が生じるかどうかについて検討した。さらに、変化の様相を探るため、Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性について検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. 高強度運動後に、外側広筋表層部位のCa²⁺-ATPase活性が低下した。
2. Ca²⁺イオノフォアを加えることにより、全ての筋においてCa²⁺-ATPase活性の増加が認められ、筋小胞体膜の変化は見られなかった。
3. 筋中乳酸濃度は、高強度運動群の外側広筋表層部位においてコントロール群よりも有意に増加し、Ca²⁺-ATPase活性との間に有意な負の相関関係が観察された。
4. 運動群のヒラメ筋においてCa²⁺-ATPase活性を50%阻害するために必要とするFITCの量が増加した。またCa²⁺-ATPaseのCa²⁺、ATPに対する親和性も増加した。

以上の結果から、高強度の運動ではCa²⁺取り込み能力が低下するが、筋小胞体膜に変化は生じないこと、このCa²⁺取り込み能力の低下に乳酸濃度の増加にともなうpHの低下が関与している可能性が示唆された。さらにヒラメ筋において、運動はCa²⁺-ATPaseのATPに対する親和性を高め、運動後のCa²⁺-ATPase活性の低下を阻止している可能性が示唆された。

実験3 一過性の低強度疲労困憊運動が筋小胞体のCa²⁺調節能力に与える影響

低強度の疲労困憊運動後に、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力あるいは筋小胞体膜のCa²⁺保持能力に変化が生じるかどうかについて検討した。さらに、変化の様相を探るため、Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性について検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. 長時間の疲労困憊運動後ヒラメ筋と外側広筋の表層部位・深層部位の筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性が低下した。
2. Ca²⁺イオノフォアを加えることにより、全ての筋においてCa²⁺-ATPase活性の増加が認められ、筋小胞体膜に変化は生じていなかった。
3. Ca²⁺-ATPaseのATPとCa²⁺に対する親和性に変化はなかった。

以上の結果から、低強度・長時間の疲労困憊運動においても筋小胞体の膜に損傷は生じないことが示唆された。また疲労困憊運動により、筋小胞体Ca²⁺取り込み能力は低下するが、高強度の運動と異なりATPとCa²⁺に対する親和性は変化しないことが明らかとなった。

実験4 持久性トレーニングによる筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の変化

持久性トレーニングにより筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性が変化するかどうかについて、さらにトレーニングが一過性の疲労困憊運動後のCa²⁺-ATPase活性の変化に与える影響について検討した。得られた結果は以下の

通りである。

1. 持久性トレーニングによりヒラメ筋のCa²⁺-ATPase活性が低下した。外側広筋深層部位では、有意な変化は観察されなかった。
2. トレーニング群のヒラメ筋では一過性の運動によるCa²⁺-ATPase活性の低下が抑制された。
3. 外側広筋深層部位では、非トレーニング群は運動1時間後からCa²⁺-ATPase活性が低下したが、トレーニング群では疲労困憊時のみCa²⁺-ATPase活性の低下が観察された。

以上の結果から、トレーニングによる筋小胞体Ca²⁺-ATPase活性の変化は筋により異なることが明らかとなった。さらに、疲労困憊に至るような運動時、トレーニングした条件での遅筋型の筋線維は、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低下が筋疲労の要因にならない可能性が示唆された。

謝辞

本論文を終えるにあたり、長年に渡り懇切丁寧なご指導を賜りました筑波大学体育科学系・勝田 茂教授に心から感謝の意を表します。また論文作成にあたり御校閲，ご助言を頂きました体育科学系・松田光生教授，齊藤慎一助教授に心よりお礼申し上げます。そして，実験の立案から，実施，論文作成など多大なるご指導を賜りました広島大学総合科学部・和田正信助教授に深甚なる謝意を表します。

引用文献

- Ariano, M. A., Armstrong, R. B. & Edgerton, V. R. 1973. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.* **21**, 51-55.
- Allen, D. G., Lee, J. A. & Westerblad, H. 1989. Intracellular calcium and tension during fatigue in isolated single muscle fibres from *xenopus laevis*. *J. Physiol.* **415**, 433-458.
- Armstrong, R. B. 1990. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* **22**, 429-435.
- Armstrong, R. B., Saubert IV, C. W., Sembrowich, W. L., Shepherd, R. E. & Gollnick, P. D. 1974. Glycogen depletion in rat skeletal muscle fibers at different intensities and durations of exercise. *Pflügers Arch.* **352**, 243-256.
- Baker, A. J., Brandes, R. & Weiner, M. W. 1995. Effects of intracellular acidosis on Ca^{2+} activation, contraction, and relaxation of frog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **268**, C55-C63.
- Belcastro, A. N. 1987. Myofibril and sarcoplasmic reticulum changes during muscle development: activity vs inactivity. *Int. J. Biochem.* **19**, 945-948.
- Belcastro, A. N., Gilchrist, J. S. & Scrubb, J. 1993. Function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles with exercise. *J. Appl. Physiol.* **75**, 2412-2418.
- Bonner, H. W., Leslie, S. W. & Combs, A. B. 1976. Effects of exercise training and exhaustion on ^{45}Ca uptake by rat skeletal muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* **14**, 767-770.
- Brautigan, D. L., Kerrick, W. G. L. & Fisher, E. H. 1979. Stimulation of sarcoplasmic reticulum by insulin and glucose-6-phosphate. *Fed. Proc.* **38**, 305.

Brooks, G. A. & White, T. P. 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.* **45**, 1009-1015.

Brotto, M. A. P. & Nosek, T. M. 1996. Hydrogen peroxide disrupts Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* **81**, 731-737.

Bruton, J. D., Lännergren, J. & Westerblad, H. 1998. Mechanisms underlying the slow recovery of force after fatigue: importance of intracellular calcium. *Acta Physiol. Scand.* **162**, 285-293.

Byrd, S. K. 1992. Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.* **24**, 531-536.

Byrd, S. K., Bode, A. K. & Klug, G. A. 1989a. Effect of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J. Appl. Physiol.* **66**, 1383-1389.

Byrd, S. K., McCutcheon, L. J., Hodgson, D. R. & Gollnick, P. D. 1989b. Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* **67**, 2072-2077.

Cady, E. B., Elshove, H., Jones, D. A. & Moll, A. 1989. The metabolic causes of slow relaxation in fatigued human skeletal muscle. *J. Physiol.* **418**, 327-337.

Chin, E. R. & Green, H. J. 1996. Effects of tissue fractionation on exercise-induced alterations in SR function in rat gastrocnemius muscle. *J. Appl. Physiol.* **80**, 940-948.

Chin, E. R., Green, H. J., Grange, F., Dossett-Mercer, J. & O'Brien, P. J. 1995. Effects of prolonged low frequency stimulation on skeletal muscle sarcoplasmic

reticulum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 1154-1164.

Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. & Williams, R. S. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Development* **12**, 2499-2509.

Colomo, F., Lombardi, V. & Piazzesi, G. 1988. The mechanisms of force enhancement during constant velocity lengthening in tetanized single fibres of frog muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**, 489-502.

Coyle, E. F. 1992. Carbohydrate supplementation during exercise. *J. Nutr.* **122**, 788-795.

Dettbarn, C. & Palade, P. 1991. Effects of alkaline pH on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and Ca^{2+} uptake. *J. Biol. Chem.* **266**, 8993-9001.

Doucet, J. P. & Trifaro, J. M. 1988. A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel system of high resolution. *Anal. Biochem.* **168**, 265-271.

Duan, C., Hayes, D. A. & Armstrong, R. B. 1990. Effects of Ca^{2+} and verapamil on muscle injury immediately after exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **22**, S132.

Dux, L. 1993. Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **122**, 93-111.

Ferry, A., Amiridis, I. & Rieu, M. 1992. Glycogen depletion and resynthesis in the rat after downhill running. *Eur. J. Appl. Physiol.* **64**, 32-35.

Fitts, R. H., Courtright, J. B., Kim, D. H. & Witzmann, F. A. 1982. Muscle fatigue

with prolonged exercise: contractile and biochemical alterations. *Am. J. Physiol.* **242**, C65-C73.

Fridén, J. & Lieber, R. L. 1996. Ultrastructural evidence for loss of calcium homeostasis in exercised skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **158**, 381-382.

Gollnick, P. D. 1986. Metabolic regulation in skeletal muscle: Influence of endurance training as exerted by mitochondrial protein concentration. *Acta Physiol. Scand.* **128**, 53-66.

Gollnick, P. D., Körge, P., Karpakka, J. & Saltin, B. 1991. Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiol. Scand.* **142**, 135-136.

Hämäläinen, N. & Pette, D. 1997. Coordinated fast-to-slow transitions of myosin and SERCA isoforms in chronically stimulated muscles of euthyroid and hyperthyroid rabbits. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18**, 545-554.

Hörl, W. H. & Heilmeyer, L. M. G., Jr. 1978. Evidence for the participation of a Ca^{2+} -dependent protein kinase and protein phosphatase in the regulation of the Ca^{2+} transport ATPase of the sarcoplasmic reticulum. 2. Effect of phosphorylase kinase and phosphorylase phosphatase. *Biochemistry* **17**, 766-772.

Hess, M. L., Okabe, E. & Kontos, H. A. 1981. Proton and free radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **13**, 767-772.

Inesi, G. & Hill, T. L. 1983. Calcium and proton dependence of sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biophys. J.* **44**, 271-280.

Jorgensen, A. O. & Jones, L. R. 1986. Localization of phospholamban in slow but

not fast canine skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* **261**, 3775-3781.

Kargacin, M. E., Scheid, C. R. & Honeyman, T. W. 1988. Continuous monitoring of Ca^{2+} uptake in membrane vesicles with fura-2. *Am. J. Physiol.* **245**, C694-C698.

Kim, D. H., Wible, G. S., Witzmann, F. A. & Fitts, R. H. 1981. The effect of exercise-training on sarcoplasmic reticulum function in fast and slow skeletal muscle. *Life Sci.* **28**, 2671-2677.

Korge, P. & Campbell, K. B. 1994. Local ATP regeneration is important for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump function. *Am. J. Physiol.* **267**, C357-C366.

Kuno, S., Akisada, M. & Mitsumori, F. 1992. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study on the effects of endurance training in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* **65**, 197-201.

Leberer, E., Härtner, K.-T. & Pette, D. 1987. Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* **162**, 555-561.

Leberer, E. & Pette, D. 1986. Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase, calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur. J. Biochem.* **156**, 489-496.

LePeuch, C. J. & Demaille, J. G. 1989. Covalent regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* **10**, 397-400.

Lowe, D. A., Warren, G. L., Hayes, D. A., Farmer, M. A. & Armstrong, R. B. 1994. Eccentric contraction-induced injury of mouse soleus muscle: effect of varying $[\text{Ca}^{2+}]_o$. *J. Appl. Physiol.* **76**, 1445-1453.

Lowry, O. H. & Passonneau, J. V. 1972. Lactate Method II. In A flexible system of

enzymatic analysis pp. 199-201. New York and London: Academic Press.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Luckin, K. A., Favero, T. G. & Klug, G. A. 1991. Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca²⁺-ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46**, 391-405.

Madsen, K., Franch, J. & Clausen, T. 1994. Effects of intensified endurance training on the concentration of Na,K-ATPase and Ca-ATPase in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **150**, 251-258.

Mandel, F., Kranias, E. G., DeGende, A. G., Sumida, M. & Schwartz, A. 1982. The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* **50**, 310-317.

Metzger, J. M. & Fitts, R. H. 1987. Fatigue from high- and low-frequency muscle stimulation: contractile and biochemical alterations. *J. Appl. Physiol.* **62**, 2075-2082.

Nosaka, K. & Clarkson, P. M. 1996. Variability in serum creatine kinase response after eccentric exercise of the elbow flexors. *Int. J. Sports Med.* **17**, 120-127.

Parsons, D., Tritchler, G., Dickinson, A. & Byrd, S. 1992. Effects of fatigue on sarcoplasmic reticulum calcium uptake in female cyclists. *Physiologist* **35**, 215.

Passonneau, J. V. & Lauderdale, V. R. 1974. A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Anal. Biochem.* **60**, 405-412.

Pette, D. & Vrbová, G. 1985. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* **8**, 676-689.

- Radák, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N. & Ohno, H. 1995. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* **79**, 129-135.
- Reid, M. B., Haack, K. E., Franchek, K. M., Valberg, P. A., Kobzik, L. & West, M. S. 1992. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J. Appl. Physiol.* **73**, 1797-1804.
- Sahlin, K., Edström, L., Sjöholm, H. & Hultman, E. 1981. Effects of lactic acid accumulation and ATP decrease on muscle tension and relaxation. *Am. J. Physiol.* **240**, C121-C126.
- Scherer, N. M. & Deamer, D. W. 1986. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 589-601.
- Simonides, W. S. & van Hardeveld, C. 1990. An assay for sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in muscle homogenates. *Anal. Biochem.* **191**, 321-331.
- Sjödin, B., Thorstensson, A., Frith, A. K. & Karlsson, J. 1976. Effect of physical training on LDH activity and LDH isozyme pattern in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **97**, 150-157.
- Spande, J. I. & Schottelius, B. A. 1970. Chemical basis of fatigue in isolated mouse soleus muscle. *Am. J. Physiol.* **219**, 1490-1495.
- Srere, P. A. 1969. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* **13**, 3-5.
- Stienen, G. J. M., VanGraas, I. A. & Elzinga, G. 1993. Uptake and caffeine-induced release of calcium in fast muscle fibers of *Xenopus laevis*: effects of MgATP and Pi.

Am. J. Physiol. **265**, C650-C657.

Viitasalo, J. T. & Komi, P. V. 1981. Effects of fatigue on isometric force- and relaxation-time characteristics in human muscle. *Acta Physiol. Scand.* **111**, 87-95.

Viitasalo, J. T., Komi, P. V., Jacobs, I. & Karlsson, J. 1982. Effects of prolonged cross-country skiing on neuromuscular performance. In P. V. Komi (Ed.), *Int. Ser. Sport Sciences Exercise and Sport Biology* pp. 191-198.

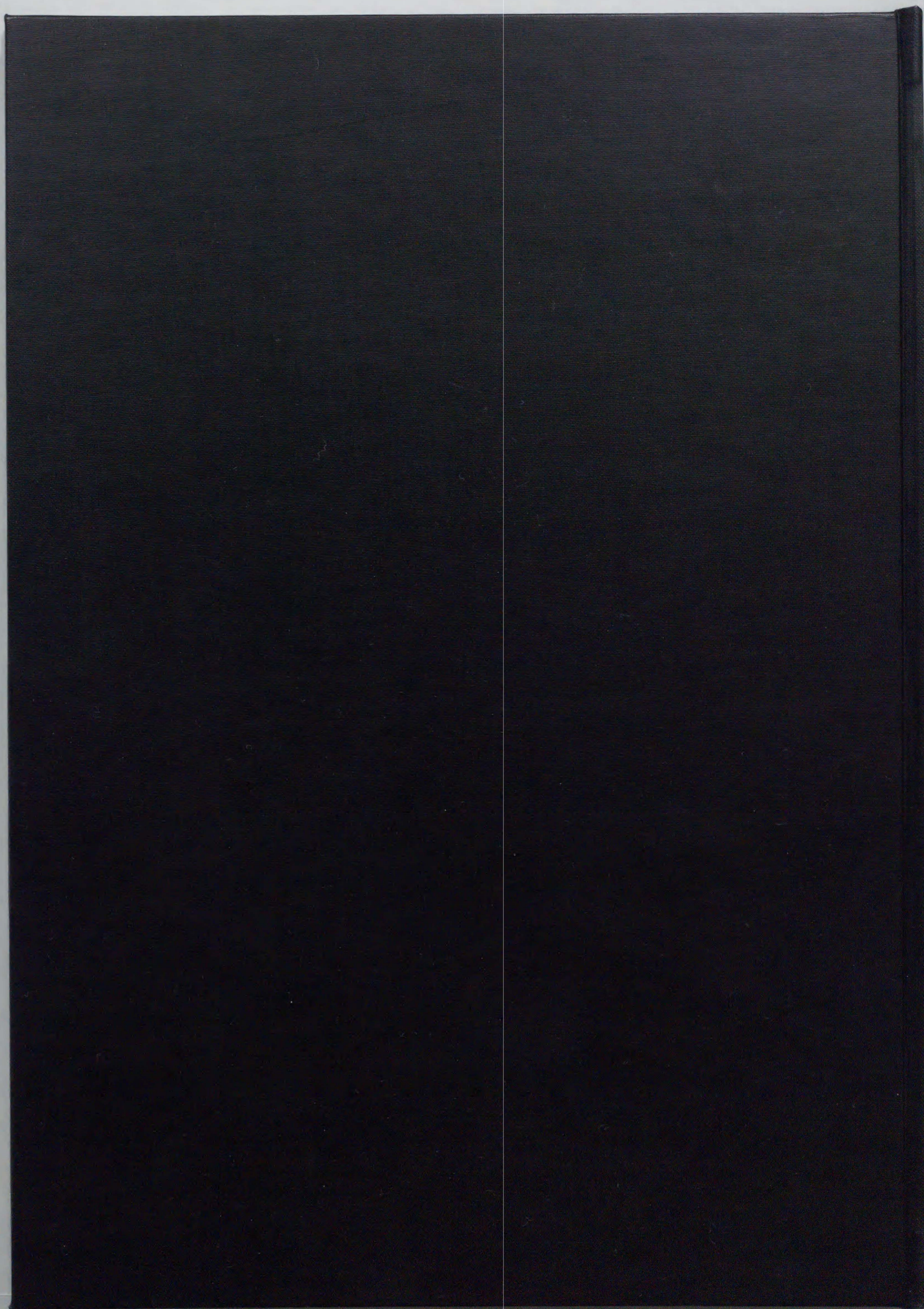
和田正信, 土持裕胤. 1996. 運動による筋小胞体機能の変化. *Jpn. J. Sports Sci.* **15**, 279-285.

Westerblad, H. & Allen, D. G. 1993. The contribution of $[Ca^{2+}]_i$ to the slowing of relaxation in fatigued single fibres from mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* **468**, 729-740.

Williams, J. H. & Klug, G. A. 1995. Calcium exchange hypothesis of skeletal muscle fatigue: a brief review. *Muscle Nerve* **18**, 421-434.

Williams, J. H. & Ward, C. W. 1992. Reduced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum at low pH. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**, 926-930.

山下勝正. 1996. トレーニングと骨格筋筋小胞体. 山田 茂, 福永哲夫 (編), *生化学・生理学からみた骨格筋に対するトレーニング効果*, pp. 81-99. 東京: ナップ.

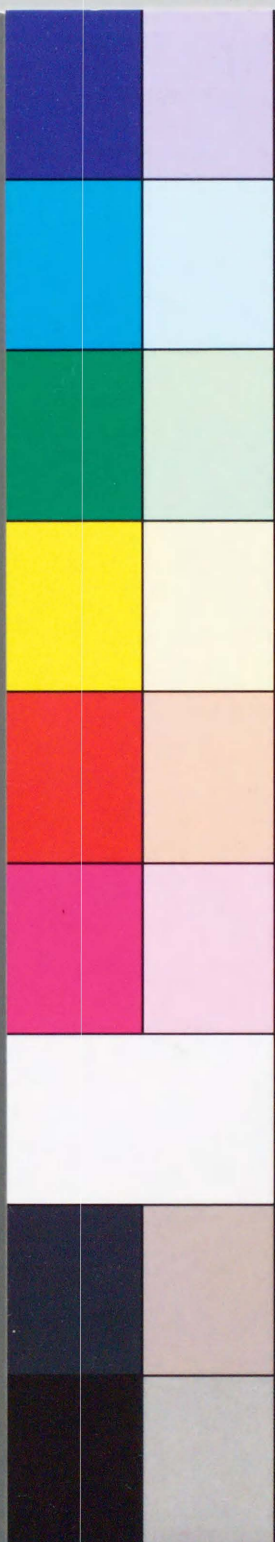


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

