熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせが 廃用性筋萎縮に与える影響

吉原利典^{1,2)} 杉浦崇夫²⁾ 芝口 翼²⁾ 山元勇樹³⁾
後藤勝正⁴⁾ 磯山智美⁵⁾ 内藤久士¹⁾ 大森大二郎⁶⁾ 吉岡利忠⁷⁾

EFFECTS OF COMBINATION OF HEAT STRESS AND ASTAXANTHIN SUPPLEMENTATION ON DISUSE MUSCLE ATROPHY

TOSHINORI YOSHIHARA, TAKAO SUGIURA, TSUBASA SIBAGUCHI, YUKI YAMAMOTO,
KATSUMASA GOTO, TOMOMI ISOYAMA, HISASHI NAITO, DAJIRO OHMORI and TOSHITADA YOSHIOKA

Abstract

The purpose of this study was to examine the effects of combination of a heat stress and astaxanthin supplementation, known as a potent anti-oxidative nutrient, on muscle protein degradation and disuse muscle atrophy. Fifty-two male Wistar rats (261.7 ± 1.17 g) were divided into five groups: control (Cont, n=10), suspension (Sus, n=11), heat stress and suspension (Heat, n=10), astaxanthin and suspension (Ax, n=10) and heat stress, astaxanthin and suspension (H+A, n=11). There were no significant differences in Cu,Zn-SOD, cathepsin L and caspase-3 levels among the Heat, Ax and H+A groups in the soleus and plantaris muscles. Although levels of calpain 2 and ubiquitinated protein in the myofibrillar fraction in the soleus muscle were not significantly different among the Heat, Ax and H+A groups, levels in the H+A group were significantly ($p < 0.05$) lower than Sus. Concerning atrophied plantaris muscles, the H+A group significantly ($p < 0.05$) suppressed the expression of calpain 1 in the myofibrillar fraction, but there were no marked changes of proteolytic indexes. These data indicate that the combination of the heat stress and astaxanthin supplementation could be effective in inhibiting muscle protein degradation in disuse atrophy of the soleus.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2010, 59 : 303~312)

key words : hindlimb-suspension, protein degradation, heat stress, anti-oxidative nutrient

I . 緒 言

不活動により誘発される筋萎縮（廃用性筋萎縮）は、骨格筋活動の低下による活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）産生の増大とそれに関連したタンパク質分解の亢進によって生じることが報告

されている^{1,2)}。生体内において、ROSの産生が抗酸化能力を上回ることにより酸化ストレスが増大し、主要な筋タンパク質分解経路として知られているリソソーム系、カルパイン系、ユビキチン-プロテアソーム系を活性化し、筋タンパク質の分解が亢進することが知られている^{2,3)}。また、酸化ストレ

¹⁾ 順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科
〒270-1695 千葉県印西市平賀学園台1-1

²⁾ 山口大学教育学部スポーツ健康科学教室
〒753-8513 山口市大字吉田1677-1

³⁾ 筑波大学大学院人間総合科学研究科
〒305-8574 茨城県つくば市天王台1-1-1

⁴⁾ 豊橋創造大学リハビリテーション学部
〒440-8511 愛知県豊橋市牛川町松下20-1

⁵⁾ 東洋酵素化学株式会社
〒279-0041 千葉県浦安市堀江4-4-27

⁶⁾ 順天堂大学医学部化学研究室
〒270-1695 千葉県印西市平賀学園台1-1

⁷⁾ 弘前学院大学
〒036-8577 青森県弘前市稔町13-1

Graduate School of Health and Sports Science, Juntendo University, Inzai, Chiba 270-1695, Japan

Department of Exercise and Health Sciences, Faculty of Education, Yamaguchi University, Yamaguchi, Yamaguchi 753-8513, Japan

Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8574, Japan

Laboratory of Physiology, Toyohashi SOZO University, Toyohashi, Aichi 440-8511, Japan

Toyo Koso Kagaku Co. Ltd., Urayasu, Chiba, 279-0041, Japan

Department of Chemistry, School of Medicine, Juntendo University, Japan

Hirosaki Gakuin University, Hirosaki, Aomori 036-8577, Japan

スの増大は, ミトコンドリアからのチトクロム c の放出を促進し, Caspase-3 を介した筋核アポトーシスを誘導することで筋萎縮を引き起こすと考えられている²⁾。

このような廃用性筋萎縮に対する対抗策として, 熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein: HSP) や抗酸化剤であるアスタキサンチンに着目した研究が行われている。HSP は体温上昇だけでなく, 酸化ストレスや虚血などの様々なストレスによって誘導されるストレスタンパク質で, ストレス環境から細胞を保護するために, 損傷したタンパク質の凝集抑制, または一部変性したタンパク質の修復などの機能を有している。これまで, Naito らは, 尾部懸垂によって筋萎縮を誘導する前の熱ストレス負荷が, HSP72 発現量を増加させ, ヒラメ筋の萎縮を抑制したことを報告している⁴⁾。一方, 廃用性筋萎縮に対する抗酸化剤の効果については, ビタミン E を中心に多くの研究が行われているが^{5~7)}, 近年アスタキサンチンが β -カロテンやビタミン E 以上の抗酸化能力を持つことが明らかになり, 筋萎縮に対するアスタキサンチンの効果に関する報告も散見されるようになってきた^{8~10)}。アスタキサンチンは鮭などに含まれるカロテノイドの一種で, その抗酸化能力はビタミン E (α -トコフェロール) と比較し, 一重項酸素に対しては約 100 倍, 過酸化脂質生成反応に対しては約 1000 倍高いといわれている¹¹⁾。これまで, 我々は 10 日間のギプス固定に誘発される筋萎縮に対し, アスタキサンチンを投与することで酸化ストレスやタンパク質分解酵素の発現が低下し, 足底筋における萎縮が抑制されたことを報告した⁸⁾。

以上のように, 廃用性筋萎縮に対する対抗策として熱ストレス負荷やアスタキサンチン投与に着目した研究が行われているが, それらの組み合わせの処置が筋萎縮に与える影響を検討した報告はこれまで行われていない。そこで本研究は, 筋萎縮誘導前後における熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が筋萎縮抑制に効果的であるか否かを, 筋タンパク質分解に関わるタンパク質分解経路の指標から検討することを目的とした。

Ⅱ. 方 法

A. 実験動物

本研究は, 国立大学法人山口大学における動物使

用に関する規則に従い実施した。実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄ラット 52 匹 (体重; 261.7 ± 1.17 g) を用い, 室温 $24.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 湿度 50~60%, 12 時間の明暗サイクルを維持した環境下で飼育を行った。1 週間の予備飼育後, ラットを体重が等しくなるように対照群 (Cont 群; $n=10$), 尾部懸垂群 (Sus 群; $n=11$), 尾部懸垂+熱ストレス群 (Heat 群; $n=10$), 尾部懸垂+アスタキサンチン摂取群 (Ax 群; $n=10$), および尾部懸垂+熱ストレス+アスタキサンチン摂取群 (H+A 群; $n=11$) に分け, Cont 群, Sus 群および Heat 群には粉末飼料 (CE-2, Clea Japan, INC.) にアスタキサンチン非含有パウダー (東洋酵素化学株式会社) を混ぜた飼料を, Ax 群および H+A 群にはアスタキサンチン含有パウダー (東洋酵素化学株式会社) を混ぜた飼料を飼育終了時まで摂取させた。実験試料の配合については先行研究を参考にして¹⁰⁾, アスタキサンチン (0.04%) 以外の組成がほぼ等しくなるように調整した。投与開始 2 週間後, Cont 群を除く全ての群には 7 日間の尾部懸垂を行った。また, Heat 群および H+A 群には尾部懸垂開始 1 日前, 1 日後, 3 日後および 5 日後の定時に 1 時間尾部懸垂を解除し, 42°C に設定されたチャンバー内にラットを入れて 30 分間の熱ストレスを負荷した。なお, 熱ストレス負荷を除いた残りの 30 分間は, ラットの移動時間および熱ストレス後の回復時間とした。熱ストレス負荷後, サーミスタ (日本光電, 2762C) で測定した直腸温は, $41.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であった。その間, Sus 群および Ax 群も同様に尾部懸垂を解除した。飼育期間中, ラットの摂食量および体重を測定し, 飼料や水は自由に摂取させた。

飼育期間終了後, ラットをエーテル麻酔下で屠殺し, ヒラメ筋および足底筋を摘出した。摘出した筋は速やかに筋重量を測定し, 分析まで -80°C で凍結保存した。

B. サンプル処理

凍結保存した筋の筋腹から, 50~100 mg の筋切片を切り出し, 10 倍量の Isolation Buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1% (v/v) Phosphatase inhibitor cocktail (nacalai tesque, 07574-61), 1% (v/v) Protease inhibitor cocktail (nacalai tesque, 25955-11)] を加えてホモジナイズし遠心分離した。

(3000 rpm, 4°C, 10分). 分離後, 上清を可溶性タンパク質サンプルとして回収し, 残った沈殿を用い Solaro らの方法¹²⁾により筋原線維タンパク質を抽出した. 得られた可溶性タンパク質濃度は, Protein Assay Kit (Bio Rad) を用いて測定し, 濃度が1 mg/mlになるようにSodium-Dodecylsulfate (SDS) Sample Buffer [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.3% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 0.05% (w/v) Bromophenol-blue, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol] を用いて調整した. また, 筋原線維タンパク質濃度はビュレット法を用いて測定し, 濃度が2 mg/mlになるようにSDS Sample Bufferを用いて調整した. その後, 全てのサンプルを60°Cで10分間加熱し, 分析まで-80°Cで凍結保存した.

C. イムノブロッティング

タンパク質の分析には, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 法を用いた. サンプルは, 各レーンあたり20 µgを負荷し, 10 µlの分子量マーカー (Precision Plus Protein Standards, Bio Rad, 161-0374) と共に泳動した. 泳動後, ミニトランスブロットセル (Bio Rad) を用いて, 8°Cに設定したインキュベーター内において100 Vで1時間通電し, Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF膜: GE Healthcare, RPN303F) にタンパク質を転写した. その後, 5% (w/v) Skim milk/TTBS [40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20] を用いて1時間のブロッキング処理を行った.

ブロッキング処理後, 8°Cに設定されたインキュベーター内においてCan Get Signal 1 (TOYOBO, NKBI-101) で $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 倍に希釈した一次抗体と一晩反応させた. 用いた抗体は, Anti-Cathepsin L (Bio Vision 3741-100), Anti-Calpain 1 (Cellsignaling, 2556), Anti-Calpain 2 (Cellsignaling, 2539), Anti-Multi Ubiquitin (Stressgen, SPA-205), および Anti-Caspase-3 (Stressgen, AAP-113) であった. ただし, Anti-Cu, Zn-SOD (Stressgen, SOD-100) はTTBSで 1×10^4 倍希釈とした.

一次抗体反応終了後, TTBSで10分×3回洗浄し, 室温で2時間の二次抗体反応を行った. 二次抗体は, ユビキチン化タンパク質の場合はCan Get Signal 2 (TOYOBO, NKBI-101) で 2×10^4 倍に希釈した

Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (SIGMA, A-4416), Cu, Zn-SODの場合はTTBSで 2×10^4 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (SIGMA, A-6154) を用い, それ以外はCan Get Signal 2で 2×10^4 倍に希釈した Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugateを用いた. 二次抗体反応終了後, TTBSで10分×3回洗浄し, ECL Plus (GE Healthcare, RPN2132), およびECL (GE Healthcare, RPN2106) を用いて発光させた.

D. 分析

発光させたPVDF膜は冷却CCDカメラ (Light Capture, ATTO, AE-6955) でコンピューターに取り込み, 画像解析ソフト (CS Analyzer, ATTOおよびScion Image, Scion Corporation) を用いて分析を行った. 各タンパク質の発現量は, ヒラメ筋および足底筋のそれぞれについて, Cont群を100%とし比較検討した.

E. 統計

得られたデータは, 全て平均値±標準誤差で示した. 統計学的分析は一元配置の分散分析を行い, 有意差が認められた場合には, Turkey-Kramer法による多重比較を行った. 有意水準は, 全て危険率5%未満とした.

Ⅲ. 結 果

A. 体重・摂食量

熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせが尾部懸垂後の体重および摂食量に及ぼす影響を表1に示した. 尾部懸垂後の体重は, Cont群と比較してHeat群, Ax群, およびH+A群において有意に低い値を示した ($p < 0.05$). 一方, 摂食量は尾部懸垂前後の各群間において有意な差は認められなかった.

B. 筋重量・相対筋重量

表2に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせが尾部懸垂後のヒラメ筋と足底筋の筋重量および体重1 kg当りの相対筋重量に及ぼす影響を示した. ヒラメ筋と足底筋の両筋において, Cont群と比較して尾部懸垂群の筋重量は有意に低い値を示した ($p < 0.05$). 一方, ヒラメ筋の

Table 1. Body weights and food consumption.

		Cont (n=10)	Sus (n=11)	Heat (n=10)	Ax (n=10)	H+A (n=11)
Body weight (g)	pre	401±8	391±7	390±14	403±16	389±12
	post	409±7	376±7	356±8 *	368±11 *	365±11 *
Food consumption (g/day)	pre	23.2±0.3	23.4±0.3	23.3±0.3	23.9±0.7	24.1±0.6
	post	21.9±0.7	20.1±0.9	19.2±1.3	19.2±0.9	20.1±1.1

Values are means±SE. Cont: Control; Sus: Suspension; Heat: Heat stress and suspension; Ax: Astaxanthin and suspension; H+A: Heat stress, Astaxanthin and suspension. * Significantly different ($p<0.05$) from Cont (post)

Table 2. Muscle weights and relative muscle weights.

		Cont (n=10)	Sus (n=11)	Heat (n=10)	Ax (n=10)	H+A (n=11)
Muscle weight (mg)	SOL	168.2±6.7	122.0±3.5*	131.1±2.4*	128.9±4.7*	129.9±4.5*
	PLA	435.0±11.1	369.3±6.6*	367.7±10.2*	378.4±13.8*	360.1±10.1*
Relative muscle weight (mg/kg BW)	SOL	410.7±12.8	325.3±9.5*	368.7±7.4	351.9±13.6*	357.5±11.2*
	PLA	1063.7±20.3	984.3±17.2*	1032.6±22.0	1028.6±19.9	989.2±16.0

Values are means±SE. SOL: Soleus muscle; PLA: plantaris muscle. * Significantly different ($p<0.05$) from Cont.

相対筋重量は, Cont群と比較してSus群, Ax群, およびH+A群で有意に低い値を示した ($p<0.05$). また, 足底筋の相対筋重量は, Cont群と比較してSus群において有意に低い値を示した ($p<0.05$).

C. Cu, Zn-SOD

図1に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせがヒラメ筋と足底筋のCu, Zn-SOD発現量に及ぼす影響を示した. Cu, Zn-SOD発現量は, 両筋のいずれの群間においても有意差は認められなかった.

D. Cathepsin L

図2に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせがヒラメ筋と足底筋のCathepsin Lの発現量に及ぼす影響を示した. Cathepsin L発現量は, 両筋のいずれの群間においても有意差は認められなかった.

E. Calpain 1・Calpain 2

図3に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせがヒラメ筋と足底筋の可溶性分画(A・B)および筋原線維分画(C・D)におけるCalpain 1・2発現量に及ぼす影響を示した. 可溶性分画におけるCalpain 1・2発現量は, 両筋の

いずれの群間においても有意差は認められなかった. 一方, 足底筋の筋原線維分画におけるCalpain 1発現量は, Cont群と比較してH+A群で有意に低い値を示したが ($p<0.05$), ヒラメ筋では各群間に有意差は認められなかった. また, ヒラメ筋の筋原線維分画におけるCalpain 2発現量は, Sus群と比較してHeat群およびH+A群で有意に低い値を示したが ($p<0.05$), 足底筋では各群間に有意差は認められなかった.

F. ユビキチン化タンパク質

図4に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせがヒラメ筋と足底筋の可溶性分画(A)および筋原線維分画(B)におけるユビキチン化タンパク質発現量に及ぼす影響を示した. 可溶性分画におけるユビキチン化タンパク質発現量は, 両筋のいずれの群間においても有意差は認められなかったが, ヒラメ筋の筋原線維分画では, Sus群と比較してH+A群で有意に低い値を示した ($p<0.05$). 一方, 足底筋では, 各群間に有意差は認められなかった.

G. Caspase-3

図5に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与, およびそれらの組み合わせがヒラメ筋と足底筋の

Fig.1. The expression of Cu,Zn-SOD from the soleus and plantaris muscles. Values are means $\pm$ SE. All data are represented as the percent of control values.

Fig.2. The expression of Cathepsin L from the soleus and plantaris muscles. Values are means $\pm$ SE. All data are represented as the percent of control values.

Fig.3. Effects of heat stress, astaxanthin, and combination of them on Calpain 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles. Calpain 1 (A) and 2 (B) in the soluble fraction. Calpain 1 (C) and 2 (D) in the myofibrillar fraction. Values are means $\pm$ SE. All data are represented as the percent of control values. * $p < 0.05$.

Fig.4. Effects of the combination of astaxanthin and heat stress on Ubiquitinated proteins in the soleus and plantaris muscles. Ubiquitinated proteins in the soluble (A) and myofibrillar (B) fraction. Values are means $\pm$ SE. All data are represented as the percent of control values. * $p < 0.05$.

Caspase-3発現量に及ぼす影響を示した。Caspase-3発現量は、両筋のいずれの群間においても有意差は認められなかった。

IV. 考 察

近年、アスタキサンチン投与や熱ストレス負荷により、萎縮筋におけるROSの産生や酸化傷害を抑制することで酸化ストレスの増大を軽減できることが示されている^{8,13,14}。生体内では細胞膜を構成しているリン脂質などの不飽和脂質が、ROSの一つである $\cdot\text{OH}$ により有害な過酸化脂質へと連鎖反的に酸化されるが、アスタキサンチンはこの連鎖的な過酸

化脂質の生成を抑制することで酸化ストレスの増大を軽減できるとされている¹⁵。また、HSPはストレス環境から細胞を保護するために損傷したタンパク質の凝集抑制や一部変性したタンパク質の修復などの機能を有しているだけでなく、あらかじめ非致死的な熱ストレスを負荷することによりHSPが増大した細胞では、その後に与えられる致死的な熱ストレス、あるいはその他のストレスによって生じる傷害の程度を抑えることができるという報告がある¹⁶。本研究は、このような観点から、筋萎縮時に熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせを処置することで、萎縮筋における酸化ス

Fig.5. The expression of Caspase-3 from the soleus and plantaris muscles. Values are means $\pm$ SE. All data are represented as the percent of control values.

ストレスの増大やそれに伴うタンパク質分解を効果的に抑制できるとの仮説を設定し、両者の組み合わせの処置が廃用性筋萎縮に及ぼす影響について検討した最初の研究である。得られた所見は、熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置によって、相対筋重量の低下を有意に抑制するには至らなかったものの、タンパク質分解経路の指標からみた場合、抗重力筋であるヒラメ筋における筋タンパク質分解が抑制されることを示唆するものであった。以下に、本研究における熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置と筋タンパク質分解に関わる指標との関係について考察する。

A. 熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が酸化ストレスに及ぼす影響

尾部懸垂やギプス固定に誘発される萎縮筋では酸化ストレスが増大することが示されており²⁾、これまでの研究では、萎縮筋における酸化ストレスの増大に伴いCu,Zn-SODの活性や発現量が亢進・増加することが報告されている^{1,13,14,17)}。Cu,Zn-SODは細胞質に局在し、細胞質内の O_2^- を消去する酵素であり、その亢進・増加は細胞質内における O_2^- の産生の程度を反映している¹⁸⁾。

しかしながら、本研究ではいずれの尾部懸垂群においてもCont群と比較してCu,Zn-SOD発現量に有意な差は認められなかった。先行研究と本研究の結果の違いの原因は、本研究で用いた実験プロトコルの

違いが関係しているのかもしれない。すなわち、本研究では尾部懸垂期間中に間欠的な熱ストレスを負荷する際に尾部懸垂を行ったまま負荷することが困難であったため、実験方法論上やむを得なく接地を行った。Miyazakiら¹⁹⁾は、不活動中に接地による機械的な負荷を加えることで萎縮が軽減されることを報告しており、本研究では2日に一度接地を行ったことによって酸化ストレスの増大が十分に生じなかった可能性がある。また、先行研究では6～8週齢の若齢ラットヒラメ筋は、7～8日間の不活動により30～50%の萎縮がみられたのに対し^{20,21)}、本研究の萎縮率は30%を下回っており、比較的萎縮の程度が小さい結果となった。これらのことから、一時的ではあるが尾部懸垂中の機械的な負荷が酸化ストレスの増大を軽減したために、酸化ストレスに対する熱ストレスやアスタキサンチンの効果が認められなかったのかもしれない。今後は、尾部懸垂期間中に接地を行わないプロトコルでの検討を行い、熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにする必要がある。

B. 熱ストレス負荷およびアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が筋タンパク質分解経路に及ぼす影響

生体内において酸化ストレスが増大すると、主要な筋タンパク質分解経路として知られるリソソーム系、カルパイン系、ユビキチン-プロテアソーム系が活性化され、筋タンパク質の分解が亢進することが報告されている^{2,3)}。リソソーム系、カルパイン系が活性化される原因の一つとして、脂質の過酸化により細胞膜が傷害され、細胞内カルシウム濃度が増加することが挙げられる²²⁾。Taillandierら³⁾は、細胞内カルシウムレベルの増加が、リソソームプロテアーゼであるカテプシンLやカルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインの活性化を導き、リソソーム系やカルパイン系を介したタンパク質分解を亢進させることを報告している。なお、本研究ではカルパイン系の指標としてCalpain 1およびCalpain 2を測定しているが、両者では活性化に必要なカルシウム濃度が異なり、Calpain 1が数 μ Mであるのに対し、Calpain 2では数mMであることが知られている²³⁾。また、ユビキチン-プロテアソーム

系は、シグナル伝達因子や転写因子を制御していることが明らかになっており、筋萎縮時のタンパク質分解において主要な役割を担っていることが示されている^{2,3)}。さらに、酸化ストレスの増大は、Caspase-3を介した筋核のアポトーシスを誘導することで筋萎縮を引き起こすことが報告されている^{2,24)}。このように、筋萎縮時のタンパク質分解には生体内における酸化ストレスの増大が密接に関与しており、熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置はタンパク質分解経路の亢進抑制に対して効果的である可能性が考えられる。

本研究では、Cathepsin L発現量ならびに可用性分画におけるCalpain 1, 2発現量およびユビキチン化タンパク質発現量は、両筋のいずれの群間においても有意な増加は認められなかった。しかしながら、ヒラメ筋では、筋原線維分画におけるCalpain 2発現量は、特別な処置を行わないSus群と比較してHeat群およびH+A群で有意に低い値を示し、ユビキチン化タンパク質発現量は、Sus群と比較してH+A群で有意に低い値を示した。これは、熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が、HSPの誘導による細胞防御機能やストレスに対する抵抗性の獲得¹⁶⁾、またはアスタキサンチンの細胞膜に対する保護作用や過酸化脂質の生成反応を抑制する作用¹⁵⁾をもたらし、細胞内カルシウムやROS産生の増加、ならびにそれに伴う酸化ストレスの増大を抑制することによって筋原線維分画におけるタンパク質分解の亢進を抑制したものと考えられる。また、Taillandierら³⁾は、廃用性筋萎縮におけるタンパク質分解の大部分は、活性化されたカルパインにより細胞骨格から遊離された筋原線維タンパク質がユビキチン化され、最終的にプロテアソームによって分解されることで遂行されることを示唆しており、このことから熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置は、特に筋原線維タンパク質の分解抑制に対して効果的であると考えられる。

一方、足底筋においては筋原線維分画のCalpain 1発現量は、H+A群で最も低い値を示したものの、尾部懸垂群ではユビキチン化タンパク質に各群間で有意な差は認められなかった。このことは、ヒラメ筋と足底筋の萎縮の程度の違いが反映されていると考えられる。すなわち、速筋である足底筋は、抗重力筋であるヒラメ筋と比較して不活動に対する応答が

小さいため²⁵⁾、ヒラメ筋よりも酸化ストレスによる影響が小さいと考えられ、足底筋におけるタンパク質のユビキチン化の程度はヒラメ筋よりも小さいことが推察される。また、ユビキチンが熱ストレスやその他のストレスによって誘導され、変性タンパク質に結合して分解シグナルとして働いていることを考慮すると¹⁶⁾、7日間の尾部懸垂では、足底筋における萎縮の程度は比較的小さく、ユビキチン化タンパク質発現量に有意な増加は認められなかったのではないかと考えられる。

また、本研究では両筋のいずれの群間においてもアポトーシス経路の指標であるCaspase-3発現量に有意な差は認められなかった。Caspase-3を介したアポトーシスに起因する筋萎縮は、尾部懸垂開始初期に関与していることが示唆されている²⁶⁾。また、Caspase-3を介さずアポトーシスを誘導するアポトーシス誘発因子やエンドヌクレアーゼGは、それぞれ尾部懸垂開始24時間後または2日後にピークに達し、その後低下することも報告されている^{26,27)}。これらのことから、アポトーシスによる筋萎縮は尾部懸垂初期に起っていたため、本研究における尾部懸垂開始7日後ではCaspase-3発現量の増加がみられなかったと推察される。

V. 結 論

本研究の結果から、熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与の組み合わせの処置は、相対筋重量の低下を抑制するには至らなかったものの、抗重力筋であるヒラメ筋において、筋原線維分画のカルパイン発現量やタンパク質のユビキチン化を抑制することにより、不活動に伴う筋タンパク質分解を抑制することが示された。また、足底筋では熱ストレス負荷とアスタキサンチン投与、およびそれらの組み合わせを処置することにより相対筋重量の低下が軽減されたが、酸化ストレスや筋タンパク質分解経路の指標に変化は認められなかった。これらのことは、ヒラメ筋と足底筋の安静時における収縮活動水準の違いあるいはタンパク質合成系との関連性が考えられるが、本研究では明らかにすることはできなかった。今後は、熱ストレス負荷およびアスタキサンチン投与の組み合わせの処置が廃用性筋萎縮に与える影響について、酸化ストレスや筋タンパク質分解経路に関わる指標の経時的な変化、尾部懸垂期間中におけ

る機械的負荷，さらにはタンパク質合成に関わるシグナル伝達物質に着目して検討を行うことが必要である．

謝 辞

本研究の一部は，平成20年度科学研究費補助金基盤研究(C)(杉浦，課題番号，20500578)，平成18年度科学研究費補助金基盤研究(A)(吉岡，課題番号 18200042)ならびに平成21年度山口大学教育学部研究支援経費によって実施された．

(受理日 平成22年4月28日)

Ⅵ. 参 考 文 献

- 1) Lawler, JM., Song, W., Demaree, SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, (2003) **35**, 9-16.
- 2) Powers, SK., Kavazis, AN., McClung, JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, (2007) **102**, 2389-2397.
- 3) Taillandier, D., Auresseu, E., Meynial-Denis D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P., Ducastaing, A., Bigard, X., Guezennec, CY., Schmid, HP., Attaix, D. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J*, (1996) **316**, 65-72.
- 4) Naito, H., Powers, SK., Demirel, HA., Sugiura, T., Dodd, SL., Aoki, J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol*, (2000) **88**, 359-363.
- 5) Appel, HJ., Duarte, JA., Soares, JM. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med*, (1997) **18**, 157-160.
- 6) Servais, S., Letexier, D., Favier, R., Duchamp, C., Desplanches, D. Prevention of unloading induced atrophy by vitamin E supplementation: Links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis?. *Free Radic Biol Med*, (2007) **42**, 627-635.
- 7) Ikemoto, M., Nikawa, T., Kano, M., Hirasaka, K., Kitano, T., Watanabe, C., Tanaka, R., Yamamoto, T., Kamada, M., Kishi, K. Cysteine supplementation prevents unweighting-induced ubiquitination in association with redox regulation in rat skeletal muscle. *Biol Chem*, (2002) **383**, 715-721.
- 8) 杉浦崇夫，飯田義晴，内藤久士，大森大二郎，後藤勝正，吉岡利忠．筋萎縮に対するアスタキサンチンの効果．*体力科学*，(2005)，**54**，466.
- 9) Ikeda, Y., Tsuji, S., Satoh, A., Ishikura, M., Shirasawa, T., Shimizu, T. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, (2008) **107**, 1730-1740.
- 10) 芝口翼，杉浦崇夫，古本司，井上恒志郎，飯田義晴，磯山智美，内藤久士，大森大二郎，吉岡利忠．長期間のアスタキサンチン摂取がサルコペニアに及ぼす影響．*体力科学*，(2008)，**57**，541-552．
- 11) 鈴木信孝，太田康之，大野 智，井上正樹，小池浩司，村田幸治，亀井 勉．補完代替医 7 アスタキサンチン—サプリメント素材としての研究の現状— 総合臨床，(2005)，**54**，2546-2551．
- 12) Solaro, RJ., Pang, DC., Briggs, FN. The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim Biophys Act* (1971) **245**, 259-262.
- 13) Selsby, JT., Dodd, SL. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol*, (2005) **289**, R134-R139.
- 14) Selsby, JT., Rother, S., Tsuda, S., Prakash, O., Quindry, J., Dodd, SL. Intermittent hyperthermia enhances skeletal muscle regrowth and attenuates oxidative damage following reloading. *J Appl Physiol*, (2007) **102**, 1702-1707.
- 15) 眞岡孝至．カロテノイドと健康—その多様な生理作用— 環境と健康 体質研究会 東京 (2007) **20** 313-323．
- 16) 内藤久士，小林裕幸．運動とタンパク質・遺伝子，第一版，骨格筋におけるストレスタンパク質の発現とその役割．ナッパ，東京，(2004)，pp166-180.
- 17) Kondo, H., Miura, M., Itokawa, Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand.*, (1991) **142**, 527-528.
- 18) 近藤久雄，糸川嘉則．臨床スポーツ医学 廃用性筋萎縮と酸化的ストレス．文光堂，(1994)，**11**，785-790．
- 19) Miyazaki, M., Noguchi, M., Takemasa, T. Intermittent reloading attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. *Med Sci Sports Exerc*, (2008) **40**, 848-855.
- 20) Morita, S., Matoba, H., Sugiura, T. Effectiveness of periodic weight support activity as a countermeasure to soleus muscle atrophy during hindlimb suspension. *山口大学教育学部研究論叢*，(1997)，**47**，339-350.
- 21) Vermaelen, M., Marini, JF., Chopard, A., Benyamin, Y., Mercier, J., Astier, C. Ubiquitin targeting of rat muscle proteins during short periods of unloading. *Acta Physiol Scand*, (2005) **185**, 33-40.
- 22) Kondo, H., Itokawa, Y. Oxidative stress muscular atrophy. In., Sen, CK., Packer, L., Hanninen, O. Exercise and Oxygen Toxicity. Elsevier. Amsterdam, (1994) pp319-342.
- 23) Vermaelen, M., Sirvent, P., Raynaud, F., Astier, C., Mercier, J., Lacampagne, A., Cazorla, O. Differential localization of autolyzed calpains 1 and 2 in slow and fast skeletal muscles in the early phase of atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, (2007) **292**, C1723-C1731.
- 24) Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, JL., Debigare, R., Zheng, B., Price, SR., Mitch, WE. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*,

- (2004) 113, 115-123.
- 25) 大石康晴. 筋の萎縮とトレーニング 不活動と筋萎縮のメカニズム. 体育の科学, (2005), 55, 578-583.
- 26) Ferreira, R., Neuparth, MJ., Vitorino, R., Appell, HJ., Amado, F., Duarte JA. Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. Physiol Res, (2008) 57, 601-611.
- 27) Dupont-Versteegden, EE., Strotman, BA., Gurley, CM., Gaddy, D., Knox, M., Fluckey, JD., Peterson, CA. Nuclear translocation of EndoG at the initiation of disuse muscle atrophy and apoptosis is specific to myonuclei. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, (2006) 291, R1730-R1740.