

原 著

末梢神経障害による骨格筋内部膜機能変化

西 島 博 明

川崎医療福祉大学 医療技術学部 健康体育学科

(平成 6 年10月19日受理)

Changes of Ca-release Mechanism on Sarcoplasmic Reticulum in the Neurogenic Atrophic Skeletal Muscle

Hiroaki NISHIJIMA

Department of Health and Sports Sciences

Faculty of Medical Professions

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-01, Japan

(Accepted Oct. 19, 1994)

Key words : sarcoplasmic reticulum (SR), Ca-release, neurogenic atrophy, skeletal muscle, denervated muscle

Abstract

It is known that the function of skeletal muscle is dependent on the integrity of the relevant motoneurone. The contraction of skeletal muscle was caused by the Ca release from the sarcoplasmic reticulum (SR) which was induced by the depolarization of T-tubular membranes with the nerve-stimulus. Therefore, it has been speculated that the function of Ca release channels on the SR tightly contacted with the voltage dependent Ca channels in the T-tubular membranes. However, the relationship of both Ca-channels remains the key unresolved problem in excitation-contraction coupling. In this experiment, the physico-chemical aspects of Ca release channels on the SR in the atrophied skeletal muscle which was induced by the deflection of the relevant motoneurone were examined. While the Ca-uptake in SR decreased the dependence on the denervated periods, the Ca-release from SR by caffeine vanished rapidly. However, the vanished Ca-release from SR recovered with the innervation of the relevant nerve. When the ryanodine binding in the Ca-release channels on SR was examined, the affinity for ryanodine on the SR in the denervated muscle was reduced in height, with no change in the maximum number of binding sites. These results indicated that the changes in physicochemical aspects of the voltage dependent Ca-channels on T-tubular membranes

worked a revolution in that of Ca-release channels as the ryanodine binding sites.

要 約

骨格筋の収縮—弛緩障害の成因は筋自体と支配神経に起因する場合が多い。末梢神経障害によって引き起こされる骨格筋の萎縮は支配神経の再修復によって回復することが知られている。一方、神経刺激は支配骨格筋筋鞘T管膜の脱分極を導く、この情報が筋細胞内 Ca イオン貯留部位である小胞体膜からの Ca イオン遊離を引き起こす。骨格筋の収縮は小胞体膜からの Ca イオン遊離によって引き起こされる。即ち、T管膜電位依存性 Ca-channel と筋小胞体膜の Ca release channel の機能は密接に連携しているとされる。

そこで本実験は骨格筋の支配神経を離断した場合に支配骨格筋の筋小胞体膜 Ca release channel 機能がどのような変化を受けるか、さらにT管膜電位依存性 Ca-channel との関係について検討した。その結果、脱神経骨格筋小胞体膜 Ca 遊離は脱神経によって消失し、神経再支配によって骨格筋小胞体膜の Ca 遊離機能は回復することが明らかとなった。しかし、筋小胞体膜の Ca release channel 開口の指標となる ryanodine 結合を調べると、脱神経筋小胞体膜 Ca release channel の ryanodine 結合の Bmax は正常小胞体膜の Ca release channel の ryanodine 結合の Bmax と同等であるにも拘わらず、Kd 値は明らかな相違を示した。この結果は Dihydropyridine 系薬剤によってT管膜のL型 Ca-channel の抑制によって引き起こされる小胞体膜 Ca-channel の抑制とは異なる結果である。従って、T管膜のL型 Ca-channel の蛋白構造変化が小胞体膜の Ca release channel に直接連動している可能性を示唆していると同時にT管膜のL型 Ca-channel の蛋白構造変化には幾つかのプロセスが有るように考えられる。

緒 言

骨格筋の収縮—弛緩障害の成因は筋自体に、または支配神経に起因する場合が多い。筋自体障害を持つ骨格筋の萎縮は不可逆的变化を示すが、末梢神経障害によって引き起こされる上肢、下肢骨格筋の萎縮は支配神経の再修復によって回復する事は臨床的によく知られている。しかし、長期間にわたる神経障害による骨格筋の収縮弛緩障害は神経再接手術によっても回復不能となる場合が多い。これは神経機能の回復不全だけでなく筋自体の機能不全に起因する。

本来、筋の収縮弛緩は神経刺激による筋鞘膜の脱分極による情報が筋細胞内 Ca イオン貯留部位である小胞体膜からの Ca イオン遊離によって引き起こされる¹⁾。しかし、筋細胞膜の脱分極が無くても小胞体膜からの Ca イオン遊離は引き起こされることが知られている²⁾。この筋細胞の脱分極と小胞体膜からの Ca イオン遊離との関連性については Endo (1968)³⁾や Podolfsky

(1968)⁴⁾等によって Ca イオンが小胞体膜からの Ca イオン遊離を引き起こす (Ca induced Ca release) ことが報告され、筋細胞膜の脱分極と小胞体膜の Ca イオン遊離との関連が注目されてきた。最近、骨格筋細胞膜管入部であるT管膜には電位依存性 Ca チャンネルが存在し、電位依存性 Ca release channel として機能するとされている⁵⁾。一方、筋小胞体膜には Endo 等の Ca induced Ca release を司る Ca release-channel の存在が論議され⁶⁾、ryanodine がこのチャンネルに結合する事が明らかとなった⁷⁾。この ryanodine 結合 Ca release channel はT管膜と接する小胞体膜の Foot 部位に存在することが示唆され^{8,9)}、骨格筋における興奮収縮関連 (E-C Coupling) の現在の問題点はT管膜脱分極から筋小胞体膜からの Ca イオン放出に至る過程であるとされている。従って、骨格筋の興奮収縮連関が脱神経によってどの様に变化するから興奮収縮連関を知る一助となる。

本実験は骨格筋T管膜脱分極の元となる神経

刺激を離断した場合に小胞体膜における Ca イオン取り込み、遊離機構がどの様に変化するかを明らかにすることによって、脱神経による T 管膜脱分極性の変化が小胞体膜の Ca イオン遊離機能との関連性を知る事を目的とした。

実験方法

実験動物

ラット(体重150g, ウイスター系)下肢筋 EDL (Extensore Digitorum longus-EDL) を使用した。除神経は EDL 支配神経である座骨神経を脊髄進入部 5 mm の部位で切断し、切断神経の中核側、抹消側両断端部をナイロン紙で包み、縫合糸で結んだ。尚、神経再接合時にはこの部位で断端形成術後に再縫合術を行った¹⁰⁾。

筋小胞体膜の分離

下肢筋 EDL からの筋小胞体膜は Nishijima, et al. (1978)¹¹⁾ によって分離し、Ca-取り込み、遊離機能の測定用にもちいた。また、³H]-Ryanodine 結合実験用には Imagawa, et al. (1989)¹²⁾ に従って分離した。

分離筋小胞体膜 (FSR) の Ca-取り込み、遊離機能の測定

分離筋小胞体膜 (145-160 μ g/ml) を 100mM KCl, 1.0mM MgCl₂, 20mM Tris-maleate Buffer (pH6.8), 3.0mM ATP 溶液中に 20 $^{\circ}$ C 下で浮遊させた。FSR の Ca²⁺ 取り込み量は 55 μ M ⁴⁵Ca-CaCl₂ の添加によって筋小胞体膜に取り込まれる Ca²⁺ 量によって測定した。分離筋小胞体膜の Ca²⁺ 遊離能は分離筋小胞体膜内 Ca 量が最大値を示した時点で最終濃度 1.03mM の Caffeine を添加し、遊離される Ca²⁺ 量で評価した。FSR に取り込まれた ⁴⁵Ca 量と反応溶液中の ⁴⁵Ca 量は液体シンチレーションカウンターで測定した。また反応溶液中の全 Ca 量は原子吸光光度計 (Hitachi-158) で測定した¹³⁾。

分離筋小胞体膜 (FSR) のリアノジン結合の測定

骨格筋筋小胞体膜の [³H]-Ryanodine 結合は Imagawa, et al (1989)¹²⁾ が示した実験条件で行った。即ち、1.0M KCl, 0.32M sucrose, 20mM Tris-HCl (pH7.4), 2.0mM dithiothreitol, 25 μ M CaCl₂, 1.0mM ATP である。この溶液条

件は筋小胞体膜の非脱分極性 Ca release channel への ryanodine 最大含量を示す条件である。

結果と考察

1) 支配神経の離断による骨格筋湿性重量変化

本実験において体重100~400gのラット下肢筋 EDL の湿性重量は 43.4 \pm 1.2g から 42.6 \pm 1.6g であった。このラット下肢筋 EDL の湿性重量は脱神経によって経時的に低下する。この湿性重量の低下は脱神経期間に依存し、脱神経 1 週では正常筋の約 75%, 2 週では 60%, 3 週では 50%, 4 週で 40% と急速に低下する。しかし、以後 8 週では 30% であり、大きな低下を示さない (Fig. 1)。

この脱神経によって低下したラット下肢筋 EDL の湿性重量は神経再支配によって回復する。神経離断後直ちに神経再縫合した場合は再支配後 16 週で正常筋湿性重量の 90% 以上、32 週後で 100% の回復を示す。また 4 週間の脱神経期間を経過した場合でも神経再支配後 16 週後には 70% 以上、32 週後には 90% 以上の回復を示す。即ち、脱神経期間が短いほど神経再支配による筋湿性重量の回復が著明になる。

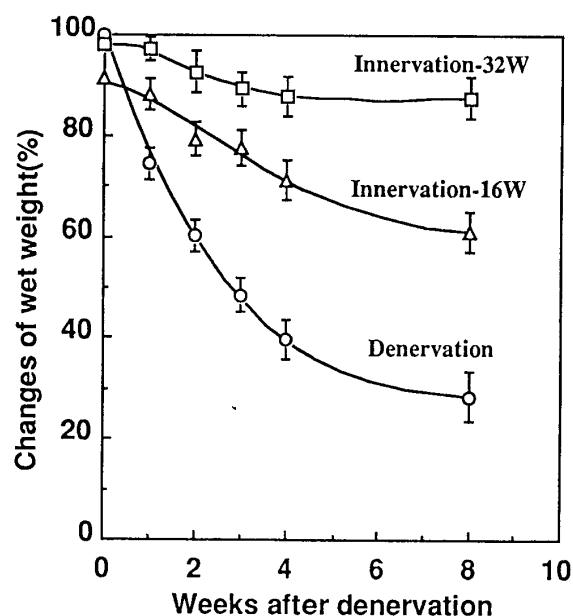


Fig. 1 Changes of wet weight of muscle in each denervation periods.

○ : Denervated muscle
 △ : 16 weeks after innervation
 □ : 32 weeks after innervation

2) 支配神経の離断による骨格筋小胞体膜の Ca 取り込み機能

本実験においてラット下肢筋 EDL から分離した筋小胞体膜の最大 Ca-uptake 量は ATP 添加後約30秒で $220-250 \times 10^{-9}$ moles/mg protein 程度を示す。この筋小胞体膜の ATP による Ca イオンの最大量取り込み量は脱神経によって経時的に低下する。この最大 Ca-uptake 量の低下は脱神経期間に依存し、脱神経1週では正常筋小胞体膜の最大 Ca-uptake 量の約79%、2週では53%、3週では42%、4週で30%と急速に低下する。しかし、以後8週では28%であり大きな低下を示さない (Fig. 2)。

この脱神経によって低下した筋小胞体膜の最大 Ca-uptake 量は Fig. 1 に示した湿性重量の場合と同様に神経再支配によって回復する。神経離断後直ちに神経再縫合した場合は再支配後16週で最大 Ca-uptake 量の85%、32週で100%近い回復を示す。また4週間の脱神経期間を経過した場合でも神経再支配後16週後には75%以上、32週後には90%以上の回復を示す。即ち、

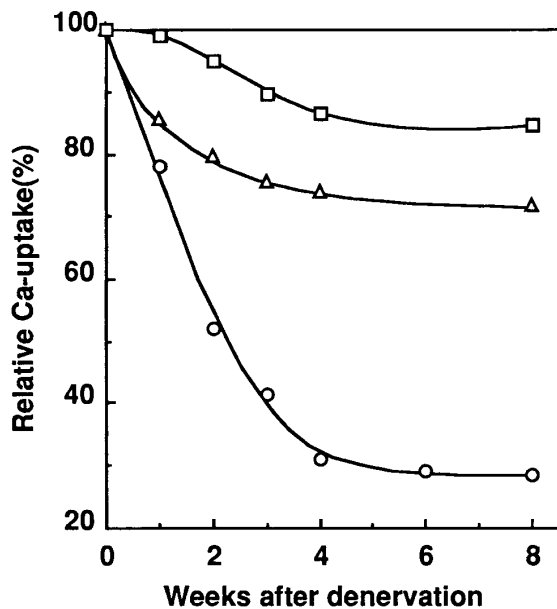


Fig. 2 Changes of Ca-uptake on the FSR from the denervated muscles (EDL) and the reinnervated muscle in each denervation periods.

- : Denervated muscle
- △ : 16 weeks after innervation
- : 43 weeks after innervation

脱神経期間が短いほど神経再支配による筋小胞体膜の最大 Ca-uptake 量の回復が著明になる。以上の結果から筋小胞体膜の最大 Ca-uptake 量は神経支配の変化によって引き起こされる骨格筋湿性重量の変化と平衡的に変化し、神経機構と筋の収縮弛緩機能とは密接に関係していることは明らかである。

3) 脱神経筋小胞体膜の Ca 取り込み, 分離 (a)脱神経, 神経再建による筋小胞体膜の Ca 取り込みの経時的变化

正常ラット下肢筋 EDL から分離した小胞体膜は ATP 添加後約30秒前後で最大 Ca-uptake 量を示す。この間の小胞体膜内 Ca 量は $220-250 \times 10^{-9}$ moles/mg protein 程度であり、外液 Ca 量は 10^{-9} moles 程度である。この条件下では細胞内外の Ca 濃度差は生理的条件下と類似した条件が設定されているものと推定される。このような条件下で正常ラット下肢筋 EDL, 脱神経期間4週後の下肢筋 EDL, 脱神経期間4週後に切断座骨神経を接合した後16週経過後の下肢筋 EDL 及び32週経過後の下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の Ca 取り込みの経時的变化と小胞体膜内からの低濃度カフェイン (1.0mM前後) による Ca 遊離を調べた。

Fig. 3 には各筋内から分離した小胞体膜の Ca 取り込みの経時的变化を示した。正常ラット下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の ATP 添加後の最大 Ca-uptake 量は15秒で 221.5 ± 4.6 , 30秒で 240.1 ± 4.2 , 60秒には $246.4 \pm 4.8 \times 10^{-9}$ moles/mg protein であった。この最大量は2分前後維持することが示されている。これは ATP 添加後15秒で90%、30秒で最大取り込み量の98%以上の取り込みを示し、著明な Ca 取り込み能を有することを示している。しかし、脱神経4週後の下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の最大 Ca-uptake 量は ATP 添加後30秒には 58.1 ± 3.3 , 60秒後には $68.6 \pm 3.8 \times 10^{-9}$ moles/mg protein を示す。これは脱神経筋では小胞体膜の Ca 取り込みは最大量で1/3程度に低下し、機能的には1/4程度低下していることが示されている。しかし、脱神経期間4週後に切断座骨神経を接合した16週経過後の下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の最大 Ca 取り込み量は ATP

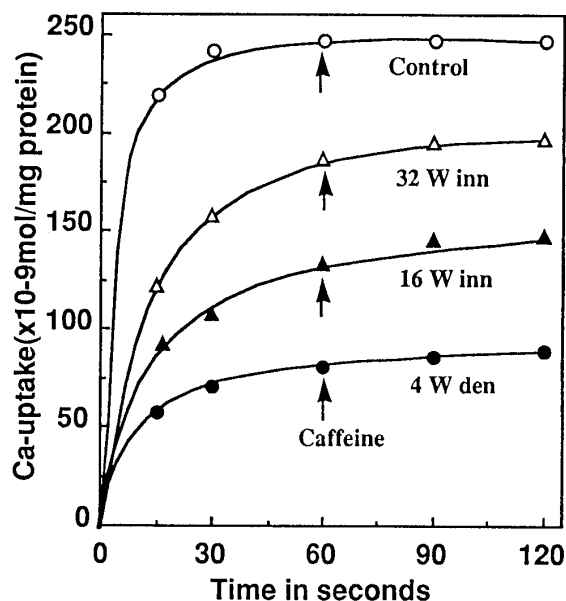


Fig. 3 Recovery of Ca-uptake on the FSR from the reinnervated muscles.

- : Control muscle
- : 4 weeks after denervation
- ▲ : 16 weeks after innervation
- △ : 32 weeks after innervation

添加後15秒後には 88.2 ± 4.2 , 30秒後には 108.2 ± 3.9 , 60秒後には $128.6 \pm 4.9 \times 10^{-9}$ moles/mg proteinであった。また神経の再接合32週経過後の下肢筋 EDL の小胞体膜の最大 Ca 取り込み量は ATP 添加後15秒後には 123.2 ± 4.1 , 30秒後には 158.2 ± 3.5 , 60秒後には $180.6 \pm 4.1 \times 10^{-9}$ moles/mg proteinであった。この結果は脱神経によって消失した Ca 取り込み能は神経支配の再建によって Ca 取り込み能が回復し, Ca 保持能力が再生したと考えられる。そこで, この回復した小胞体膜の Ca 取り込み能と小胞体膜からの Ca 遊離とはどのような関係があるかを検討した。これら各々の小胞体膜内 Ca イオンのカフェインによる Ca 遊離能を調べた。カフェインによる Ca 遊離能は正常ラット下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の ATP 添加後の最大 Ca-uptake 量が定常に達する1分後に0.93mM カフェインを添加し, 以後30, 60秒の Ca 遊離量の測定をすることによって検討した。

(b)脱神経, 神経再建による筋小胞体膜の Ca 遊離機能の変化

正常ラット下肢筋 EDL から分離した小胞体

膜の0.93mMカフェインによる Ca 遊離はカフェイン添加, 30秒, 1分後の Ca 遊離量はそれぞれ 22.8 ± 2.4 , $23.6 \pm 0.9 \times 10^{-9}$ moles/mg proteinであった。この小胞体膜からの Ca 遊離量は最大 Ca-uptake 量のそれぞれ9.4, 9.7%に相当する。しかしながら, 脱神経4週後の下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の0.93mMカフェインによる Ca 遊離はカフェイン添加1分後でも有為な Ca 遊離量は認められなかった。さらに, 脱神経期間4週後に切断座骨神経を接合した16週経過後の下肢筋 EDL から分離した小胞体膜の0.93mMカフェインによる Ca 遊離はカフェイン添加1分後でも有為な Ca 遊離量は認められなかった。しかし, 神経再建32週後のラット下肢筋 EDL から分離した小胞体膜では0.93M カフェインによる Ca 遊離はカフェイン添加30秒後には 7.7 ± 2.8 , 1分後の Ca 遊離量は $9.1 \pm 2.6 \times 10^{-9}$ moles/mg proteinであった。この Ca 遊離量は最大 Ca-uptake 量のそれぞれ4.1, 9.1%に相当し, 単位時間の Ca 遊離量は正常ラットの小胞体膜の Ca 遊離に比べて25%程度の回復を示していた (Table 1)。

以上の結果は筋小胞体膜 Ca 取り込み能と Ca 遊離は脱神経によって著しく低下することが明らかとなった。しかし, 神経再建に伴う小胞体膜 Ca 取り込み能は神経再建後その期間経過に伴って回復するが, 0.93mMカフェインによる Ca 遊離機能はほとんど回復しない。このことは脱神経によって Ca 遊離機能, 即ちT管膜脱分極から筋小胞体膜からの Ca イオン放出に至る過程の coupling が脱神経によって decoupled し, 神経再建によってもこの coupling 機構が再建されないものと考えられる。そこで, 脱神経によるT管の膜脱分極性の変化が小胞体膜の Ca イオン遊離機能にどのような変化を与えるかを検討する事とした。

4) 脱神経筋小胞体膜のリアノジン結合

植物アルカロイドである ryanodine は小胞体膜にのみ結合し¹⁴⁾, Ca-release channel を開口固定することが知られている^{15,16)}。この ryanodine はT管膜には結合せず, T管膜脱分極時のL型 Ca channel の動きが小胞体膜の Ca-release channel の動きと連動しているのであれば脱神

Table 1 Ca release from FSR by the caffeine(0.93mM)

Time after the addition of caffeine (1.0mM)	Aperiods (weeks) after reinnervation (4 weeks denervatits)			
	Control	0	16	32
30 sec	22.8 ± 2.4	2.0 ± 2.4	3.2 ± 2.3	7.7 ± 2.8
	9.40 %	-	-	4.10 %
60 sec	23.6 ± 2.9	2.1 ± 2.3	3.6 ± 2.7	9.1 ± 2.6
	9.70 %	-	-	4.80 %

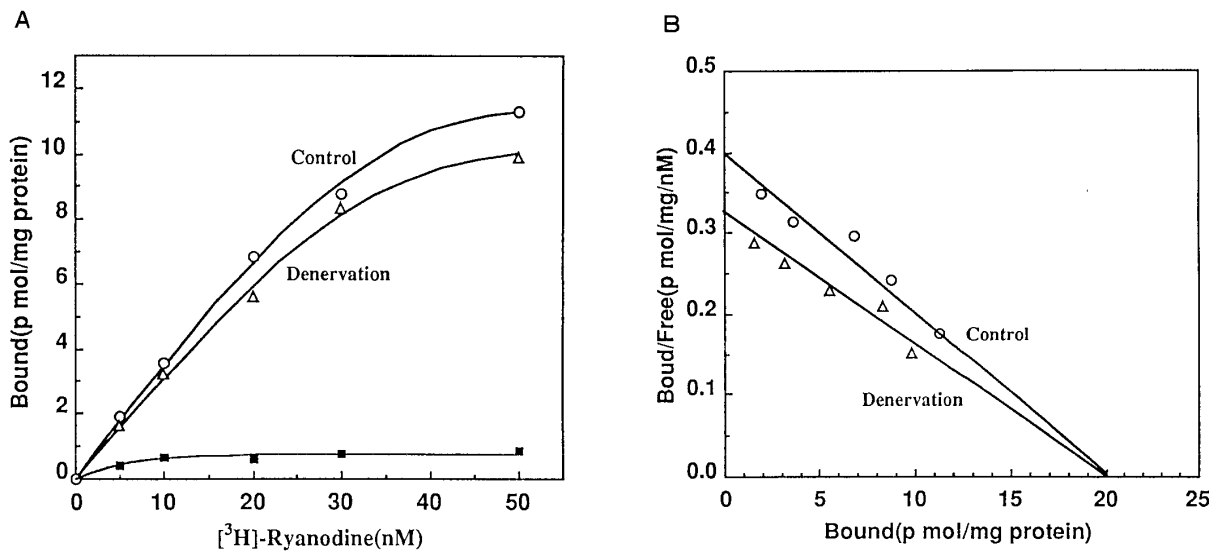
(x 10⁻⁹ moles/mg protein)

Fig. 4 Ryanodine binding on the FSR from the denervated EDL of rats.

A : Changes of the ryanodine bound dependent dependent of concentration of [³H] -ryanodine.

B : Schachard analysis of ryanodine binding

経筋小胞体膜のCa遊離低下はCa-release channelの動きを抑制する可能性を示唆する。

Fig. 4に示した様に実験に用いた正常ラット下肢筋EDLから分離した小胞体膜 [³H]-Ryanodine結合のBmaxは20.1pmol/mg proteinであった。この値は小胞体膜のCa-release channelが最大に開口され、ryanodineによって固定されたことを示している。また今回用いた試料のKd値は37~40nMであった。一方、脱神経4週後の下肢筋EDLから分離した小胞体膜 [³H]-Ryanodine結合のBmaxは正常ラット下肢筋EDLから分離した小胞体膜 [³H]-Ryanodine結合のBmaxと同様に20.1pmol/mg proteinであった。しかし、Kd値はFig.4

に示したようにこの値は45~48nMを示し明らかに正常ラットとは異なっていた。この結果は小胞体膜のCa-release channelの性質が異なっていることを示している。骨格筋のE-C couplingはT管膜と小胞体膜を連結するFootと呼ばれる構造が重要な役割を担っていると推定される。この微細構造は27*27*14nmの4回対称性を持ち、Ca induced Ca release channelと推定されている¹³⁾。1973年、Schneider and Chandler¹⁷⁾は脱分極時にT管膜で電位依存性の荷電の動きが有ることから、電位依存性(*Caチャンネル) proteinの構造変化が小胞体膜からのCa releaseを引き起こすとした”Electro-Mechanical Coupling”機構の存在を報告している。

そこで、著者はT管膜のL型 Ca-channel の蛋白構造変化が小胞体膜の Ca release channel に直接連動しているのであれば、T管膜のL型 Ca-channel を Dihydropyridine 系薬剤によって抑制された場合、小胞体膜の Ca release channel の開口が抑制されることを推論した。その結果、我々は使用したDHP系薬剤 (10^{-6} M) で10-20%程度の Bmax の抑制が示され、Kd 値には全く変化が認められないという結果を得ている¹⁸⁾。しかし、本実験では脱神経筋小胞体膜の Ca

release channel の抑制は小胞体膜 [³H]-Ryanodine 結合の Bmax の変動なしに Kd 値が変化するという結果によって筋小胞体膜の Ca release channel の抑制が示された。この結果はT管膜のL型 Ca-channel の蛋白構造変化が小胞体膜のCa release channel に直接連動している可能性を示唆している。同時にこれはT管膜のL型 Ca-channel の蛋白構造変化には幾つかのプロセスがあるように考えられる。

文 献

- 1) Endo M (1977) Ca-release from sarcoplasmic reticulum. *Physiological Review*, **57**, 71-108.
- 2) Endo M (1981) Mechanism of calcium induced release mechanism in the SR membrane. In : Onishi ST & Endo M eds, the Mechanism of Gated Calcium Transport across Biological Membranes Acad. Press, N. Y, pp257-265.
- 3) Endo S, Tanaka M and Ogawa Y (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fiber. *Nature*, **228**, 34-36.
- 4) Ford LE and Podolfsky RJ (1970) Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*, **167**, 58-59.
- 5) Glossmann H, Ferry DR and Boschck CB (1983) Purification of Putative Channel from skeletal Muscle with the Aid of [³H]-Nimodipine Binding. *Archives of Phamacology*, **323**, 1-11.
- 6) Inui M, Sito A and Fliisher S (1987) Purification of the ryanodine receptore and identity with feet structures of junctional terminal cisterunae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *Journal Biological Chemistry*, **262**, 1740-1747.
- 7) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Mastup H, Ueda M, Hanada M, Hirose T and Numa S (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptore. *Nature*, **339**, 439-445.
- 8) Imagawa T, Smith JS, Coronad R and Campbell KP (1987) Purified ryanodine receptore from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca-permiable pore of the calcium release channel. *Journal Biological Chemistry*, **262**, 16636-16643.
- 9) Sito A, Inui M, Radermacher M, Frank J and Fleischer S (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal Cell Biology*, **107**, 211-219.
- 10) Nagano T, Inai T, Kojima T and Nitshijima H (1983) Experimental study on regeneration of denervated muscle. *Transactions*, 63-66.
- 11) Nishijima H, Shiba T and Ogino Y (1987) The method of preparation of fragmented sarcoplasmic reticulum from small pieces of leg skeleton muscle. *Jikei Medical Journal*, **25**, 287-290.
- 12) Imagawa T, Takasago T and Shigekawa M (1989) Cardiac ryanodine receptore is absent in Type I slow skeletal muscle fibers : Immunochemical and ryanodine binding studies. *Journal Biochemistry*, **106**, 342-348.
- 13) Nishijima H, Yomemoto K and Sakai T (1972) Effect of temperature and agents on Ca-uptake of the fragmented sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiological Society of Japan*, **34**, 28-39.

- 14) Fleicher S, Ogunbunmi EM, Dixon MC and Fleer EA (1985) Localization of Ca release channels with ryanodine in junctional terminal cisterunae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proceeding National Academy of Science*, **82**, 7256—7259.
- 15) Meissner G (1986) Ryanodine activation and inhibition of Ca release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal Biological Chemistry*, **261**, 6300—6306.
- 16) Rousseau E, Smith JS and Meissner G (1987) Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca release channel. *American Journal Physiology*, **256**, C364—C368.
- 17) Schneider MF and Chandler WK (1973) Voltage dependent charge movement in skeletal muscle ; a possible step in excitation contraction coupling. *Nature*, **242**, 244—246.
- 18) Nishijima H, Takeshima H and Kokubunn S (1993) Effects of Dihydropyridine Ca Channel Blocker on Ca-release Channel in Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *Japanese Journal of Physiology*, **43**(suppl. 2), 161.