

二次出版

不動化早期に生じる筋原線維の能動的・受動的張力の低下： 可逆的な酸化修飾による影響

Reversible oxidative modifications partially cause myofibrillar active and
passive force decline in early phase of immobilization

渡邊 大輝¹⁾ 三島 隆章¹⁾ 浜田 拓¹⁾
Daiki Watanabe¹⁾ Takaaki Mishima¹⁾ Taku Hamada¹⁾

キーワード：ギプス固定, 活性酸素窒素種, メカニカルスキンドファイバー
Cast immobilization, Reactive oxygen nitrogen species, Mechanically
skinned fibre

I. 緒言

本論文はアメリカ生理学会誌（細胞生理学）の二次出版論文である（Watanabe et al., 2025 *Am J Physiol-Cell Physiol* 329: C939-C952, DOI: 10.1152/ajpcell.00554.2025）。不動化に伴う骨格筋の不使用は、筋線維サイズの減少と収縮機能の低下をもたらす。筋収縮機能は、筋収縮を誘発する細胞プロセスである「興奮収縮連関」に依存している。このプロセスは活動電位の伝播に始まり、続いて筋小胞体（Sarcoplasmic reticulum: SR）からの Ca^{2+} 放出が起こり、最終的に筋原線維の収縮に至る（Lamb, 2002）。Lambole et al. (2016) は、ヒトを対象とした 23 日間の不動化により、タイプ II 線維における筋原線維張力の低下とタイプ I 線維における筋小胞体内 Ca^{2+} 貯蔵量の減少が生じることを示した（Lambole et al., 2016）。したがって、筋小胞体と筋原線維の両方の機能が不動化に伴う筋機能障害において重要な役割を果たすと考えられる。筋原線維は Ca^{2+} がトロポニン複合体に結合した際、クロスブリッジ・サイクルを介して張力を発生させ、その機能は、シグモイ

ド曲線で表される筋原線維張力と細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) の関係によって評価できる（Lamb and Stephenson, 2018）。最大張力の 50% を得るために必要な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ の負の対数である pCa_{50} は、筋原線維の最大下機能の指標として用いられ、固有張力（断面積あたりの Ca^{2+} 誘発最大張力）は最大機能の指標として用いられる。先行研究では、3 週間以上の不動化により、ヒトのタイプ I およびタイプ II 線維の両方で固有張力が低下することが示されている（Larsson et al., 1996; Brocca et al., 2015; Lambole et al., 2016）。加えて、ラットのタイプ I 線維では 6 週間の不動化後に pCa_{50} と固有張力の両方が低下することが報告されている（Udaka et al., 2008）。興味深いことに、近年の研究では、筋原線維の受動的張力がミオシンフィラメントの滑走を促進し、能動的張力の発生を補助する可能性が提起されている（Rivas-Pardo et al., 2016）。筋原線維の受動的張力は、主に Z 線と M 帯をつなぐ弾性フィラメントタンパク質であるタイチン（コネクションとしても知られる）の弾性によって決定される（Maruyama

1) 大阪体育大

et al., 1976; Wang et al., 1979). ラットのタイプ I 線維において、6 週間の不動化後にタイチン由来の受動的張力が低下することが報告されている (Udaka et al., 2008).

骨格筋の不活動は、活性酸素窒素種 (reactive oxygen/nitrogen species: RONS) の産生を増加させることが知られており (Min et al., 2015; Hyatt et al., 2019), これが筋原線維の能動および受動的張力を変化させる (Dutka et al., 2011; Alegre-Cebollada et al., 2014; Dutka et al., 2017; Watanabe et al., 2020). 例えば、ペルオキシナイトライト (ONOO^-) やスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\bullet-}$) への曝露は、筋原線維の最大張力を低下させる (van der Poel et al., 2007; Dutka et al., 2011). さらに、RONS の影響は、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオン (glutathione: GSH) によって修飾されうる. 例えば、GSH とシステインとの間にジスルフィドを形成する化学反応である「S-グルタチオン化」は、Ig ドメインの折りたたみを防ぐことでタイチンの弾性を低下させる (Alegre-Cebollada et al., 2014; Watanabe et al., 2020). さらに、S-グルタチオン化は受動的張力だけでなく能動的張力にも影響を及ぼす. タイプ II 線維においては、トロポニン I の S-グルタチオン化が筋原線維の Ca^{2+} 感受性を高めることが知られている (Mollica et al., 2012). 対照的に、トロポニン I の同じシステイン残基は、一酸化窒素誘導体とシステイン残基との反応によって S-ニトロソチオールを形成する「S-ニトロソ化」も受ける. S-グルタチオン化とは異なり、トロポニン I の S-ニトロソ化は逆の効果をもたらし、筋原線維の Ca^{2+} 感受性を低下させる (Dutka et al., 2017).

本研究の目的は、不動化期間中における筋原線維の能動および受動的張力の変化を調査し、これらの変化に対する還元処理の効果を検討することであった. 我々は、還元処理によって不動化後の能動および受動的張力が回復するという仮説を立てた. RONS への長期的な曝露は不可逆的な酸化的修飾を引き起こす可能性があるため (Andrade et al., 1998; Murphy et

al., 2008), 本研究では不動化の初期段階 (1 週間以内) に焦点を当てた. 還元剤であるジチオトレイトール (DTT) は、S-グルタチオン化やジスルフィド結合形成などの可逆的な酸化修飾を還元することができる. 不動化した筋から作製したメカニカルスキンドファイバーに DTT を処置したところ、不動化後の筋原線維の能動および受動的張力が部分的に回復した. このことは、RONS が不活動に伴う収縮機能障害に直接寄与していることを示唆している. さらに根底のメカニズムを検討するために、能動的張力に対する ONOO^- の影響と受動的張力に対する S-グルタチオン化の影響をそれぞれ検証した.

II. 方法

1. 倫理承認

本研究のすべての手順は、大阪体育大学動物実験委員会 (承認番号: 23-3) の承認を得て実施された. マウスは、温度管理された室内 (22 ~ 26°C, 12 時間明暗サイクル) で飼育され、水と餌を自由に摂取させた. イソフルランの過剰投与により筋の摘出直前にマウスを安楽死させた.

2. 不動化

You ら (2015) の方法を一部改変し、マウスの片脚を不動化した (You et al., 2015). イソフルラン麻酔 (3%) 下で 1 mL チップ (94300220, Thermo Scientific, USA) の上部円筒部をカットして作成した固定具を使用して膝を固定し、関節を 180 度に固定した. 次に、固定具を挟むようにペーパークリップを取り付け、キネシオロジーテープ (3M Multipore Tape 2743, 3M, USA) で巻き、最大底屈位に固定した. 最後に、ハードテープ (3M Multipore Tape 2980, 3M, USA) で全体を覆った. 不動化処置を行った脚を不動化脚 (Im), 同一マウス内の処置をしていない脚を対側脚 (NT) とした.

23 匹の雄性マウス (11-12 週齢) を 3 日間の不動化 (N=7) と 7 日間の不動化 (N=16) の 2 群に割り当てた. 不動化後、腓腹筋 (gastrocnemius, GAS) を摘出し、リンガー液で洗浄し、軽く水

分を拭き取った後に重量を測定した。その後、メカニカルスキンドファイバーを用いて生理学的解析を行った。予備実験において、不動化7日目までNT脚と不動化していない個体の脚との間で、GASの筋重量および筋原線維機能（すなわち、固有張力および Ca^{2+} 感受性）に差がないことを確認した。

3. スキンドファイバーの作製

メカニカルスキンドファイバーは、LambとStephensonの方法に従って作製した（Lamb and Stephenson, 2018）。パラフィンオイル（室温）の入ったシャーレ中に摘出したGASを置き、腱にステンレス製のピンを刺して静止長に保持した。シャーレをアイスパックの上に置き、約10℃に維持した。実体顕微鏡下で単一筋線維を剥離し、ピンセットで機械的に表層膜を剥離した。スキンドファイバーを張力計（Muscle Tester, World Precision Instruments, USA）に接続し、0.5 mLの弛緩（Relax）溶液（後述）を満たしたチャンバーに移した。最終的にスキンドファイバーをpSr（ Sr^{2+} 濃度の負の対数）が5.2の溶液に浸漬し、使用したすべての線維がタイプIIであることを確認した（Bortolotto et al., 2000; Watanabe et al., 2024）。一部の線維においては、さらにゲル電気泳動（後述）によって筋線維タイプを同定した。

4. スキンドファイバーの溶液

Relax 溶液は、126 mM K^+ 、36 mM Na^+ 、90 mM HEPES、8 mM ATP、10 mM クレアチンリン酸、1.0 mM 遊離 Mg^{2+} （総 Mg^{2+} 8.5 mM）、50 mM EGTA（pH 7.1, 25℃）で調製した。Maximum Ca^{2+} （Max）溶液は、すべてのEGTAをCa-EGTAに置き換えた以外はRelax溶液と同様の組成とした。一部の実験では、KOHの添加によりpHを8.5に調整したRelax溶液（Relax pH 8.5溶液と呼ぶ）を使用した。

1 M DTTはRelax溶液で希釈し作製した。200 mM 酸化型グルタチオン（GSSG）は、Relax溶液で希釈し、KOHでpHを7.1にした。500 mM 3-モルホリノシドノンイミン（Sin-1）

は、Relax pH 8.5溶液で希釈し作製した。70 mM ONOO^- は3 M NaOHで希釈し作製した。これらのストック溶液は、実験日まで-80℃の冷凍庫で保存した。実験当日、DTTとGSSGはRelax溶液（pH 7.1）でそれぞれ最終濃度10 mMと20 mMに希釈した。Sin-1と ONOO^- のストック溶液は使用直前に解凍し、Relax pH 8.5溶液でそれぞれ最終濃度500 μM と3.5 mMに素早く希釈した。 ONOO^- ストック溶液の正確な濃度は、分光光度計（Varioscanner, Thermofisher Scientific, 日本）を用い、 ONOO^- の規定の吸光係数（1670 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）を使用して決定した。

5. 筋原線維の能動的張力の測定

スキンドファイバーを、Max溶液とRelax溶液を適切な比率で混合して調製したpCa値（9.0, 6.4, 6.2, 6.0, 5.8, 5.6, 5.4, 5.2および4.7）の溶液に順次曝露した。混合溶液中のpCaは、MoiescuとThieleczekが報告した結合定数（Moiescu and Thieleczek, 1978）に従って計算した。各pCaにおけるピーク張力を測定し、同一線維の Ca^{2+} 誘因性最大張力に対する割合を計算した。その値をそれぞれのpCaに対してプロットして得られた張力-pCa曲線から、pCa₅₀およびヒル係数を算出した。

すべてのスキンドファイバー測定終了後、線維の真上から撮影した顕微鏡画像から、溶液中での線維径を測定した。固有張力（ mN/mm^2 ）は、線維径と Ca^{2+} 誘因性最大張力から算出した。溶液中で測定した直径を用いて得られる固有張力の値は、オイル中で測定した場合よりも低くなる。これは、スキンドファイバーが溶液中で約15%膨張し、この膨張が最大張力の約5%の低下を招くためである（Watanabe et al., 2019）。本研究では、不動化による膨張の影響を排除するため、溶液中で測定した線維径を使用した。

固有張力は不動化7日後には低下したが3日後には低下しなかったため、7日間の不動化を行った後の線維に焦点を当てた。Dutkaらは、活性化されていない（試験前に収縮させていないもの）線維にDTTを処置した場合のみ、

RONS 処置に伴う張力低下が回復するが、活性化された線維（試験前に収縮させたもの）では DTT は影響を与えないことを報告している (Dutka et al., 2011; Dutka et al., 2012). したがって、非活性化線維および活性化線維の 2 つの場合で DTT 処理の効果を検証した. 非活性化線維を用いた実験では、スキンドファイバーを Relax 溶液で 2 分間平衡化し、サルコメア長 (SL) $2.8\mu\text{m}$ まで伸展させた. その後、10mM DTT 溶液に 10 分間浸し、その後、Max 溶液に曝露して Ca^{2+} 誘因性最大張力を測定した.

Sin-1 は溶液中で分解して一酸化窒素 ($\text{NO}^\bullet$) と $\text{O}_2^{\bullet-}$ を生成し、それらが反応して ONOO^- を形成する. pH 8.5 において Sin-1 が $500\mu\text{M}$ 存在すると、20 分間にわたり約 $5\sim 8\mu\text{M}/\text{min}$ の ONOO^- を連続的に生成できる (Tiago et al., 2006). 不動化 7 日後のスキンドファイバーに対し、pH 8.5 下で Sin-1 処理を行った. pH 8.5 で 20 分間処理した後、pH 7.1 で Ca^{2+} 活性化最大張力を測定した. さらに、Sin-1 の他の副産物 ($\text{NO}^\bullet$ および $\text{O}_2^{\bullet-}$) から ONOO^- の効果を分離するため、 ONOO^- を直接適用した. また、この場合は ONOO^- が極めて短時間で反応すること (pH 8.5 の溶液中で数秒から数十秒) を考慮し (Koppenol et al., 1992; Beckman and Koppenol, 1996), 反応時間は 1 分間とした.

6. 筋原線維の受動的張力の測定

SL は、Watanabe らの方法に従いレーザー回折法により決定した (Watanabe et al., 2020). 簡単に述べると、回折されたレーザー光が標本の周囲の溶液およびチャンバーの壁を通過して空气中を伝播する際の補正係数を含む近似式を用いて、一次回折極大の位置から平均 SL を算出した.

すべての受動張力の測定は室温 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) で行った. 分光光度用チャンバーを改良した容器を Relax 溶液で満たし、スキンドファイバーを浸けた. 線維を一度弛緩させた後、様々な SL ($2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6\mu\text{m}$) になるように伸展させた. その後、SL $2.8\mu\text{m}$ での受動張力を再測定した. 続いて、SL $2.8\mu\text{m}$ にし 10 mM

DTT で 10 分間処理した後、様々な SL で受動張力を測定した. DTT は不動化 7 日後の線維でのみ受動張力を回復させたため、S-グルタチオン化の影響をこのタイムポイントで検討した. タイチンの Ig ドメイン (S-グルタチオン化が起こる部位) を露出させるため、S-グルタチオン化の処置 (GSSG および DTT 処理) を行う場合 SL $3.6\mu\text{m}$ への伸展が必要であることが報告されている (Watanabe et al., 2020). 受動張力測定後、SL $3.6\mu\text{m}$ にして 20 mM GSSG で 15 分間処理し、再び様々な SL で受動張力を測定した. その後、SL $3.6\mu\text{m}$ にして 10 mM DTT に 10 分間曝露し、受動張力測定を行った.

7. 線維タイプの同定

測定後のスキンドファイバーを Relax 溶液で約 1 分間平衡化した後、 $10\mu\text{l}$ のサンプル緩衝液 (62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.02% ブロモフェノールブルー) に入れた. その後、7% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、室温にて 170 V で 9 時間通電した (Wada et al., 2003).

8. 筋原線維タンパク質含有量

筋原線維タンパク質含有量は、SDS-PAGE またはウェスタンブロッティングにより評価した. GAS の表層から約 20 mg を細切し、氷上で 9 倍量の高モジュライズ緩衝液 (8 M 尿素, 2 M チオ尿素, 0.13% 2-メルカプトエタノール, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.83 mM ベンズアミジン, $1.4\mu\text{M}$ ペプスタチン A, $2.2\mu\text{M}$ ロイペプチン, 5 mM フッ化ナトリウム) 中で高モジュライズした. そのサンプルを SDS-PAGE に供した.

細胞質および筋原線維抽出物において、ミオシン重鎖 (MHC) 以外に約 250 kDa のタンパク質が存在しないため (Watanabe and Wada, 2025), MHC 含有量は Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色で可視化された約 250 kDa のバンド密度によって決定した. その他のタンパク質含有量はウェスタンブロッティングを用い

で測定した。電気泳動後、タンパク質をPVDF膜に転写した。ブロッッキング後、一次抗体（抗アクチン、抗速筋型トロポニン T または抗トロポミオシン）を用いて4℃で一晩インキュベートし、洗浄後、適切な二次抗体でインキュベートした。バンドは化学発光基質で可視化し、バンド密度の解析にはCS Analyzer ソフトウェアを使用した。バンド密度は、ウェスタンブロッティング後のCBB染色による転写後の全タンパク質含有量で正規化した。

9. 統計解析

統計解析は GraphPad Prism version 10 を使用し、すべてのデータを平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。すべてのデータセットについて分布を確認した後、一元配置分散分析 (ANOVA)、二元配置分散分析、または両側 t 検定を使用し

た。同一マウス内の同一線維または筋を比較する場合、対応のある検定を適用した。ポストホック解析には Holm-Sidak 法を使用した。有意水準は5%水準とした。

Ⅲ. 結果

筋重量および筋原線維タンパク質含有量

GAS の筋重量は不動化3日目から低下した (NT: 116 ± 5.88 mg vs. Im: 107 ± 4.98 mg; $P < 0.0001$)。7日後にはさらに顕著な低下が観察された (NT: 119 ± 10.9 mg vs. Im: 99.6 ± 9.12 mg)。不動化期間にかかわらず、NT 筋と Im 筋の間で MHC、トロポミオシン、トロポニン T の含有量に差はなかった (図 1A, C, D)。アクチン含有量は不動化3日後に $85.7 \pm 12.0\%$ に、7日後には $86.1 \pm 14.4\%$ に減少した (図 1B)。

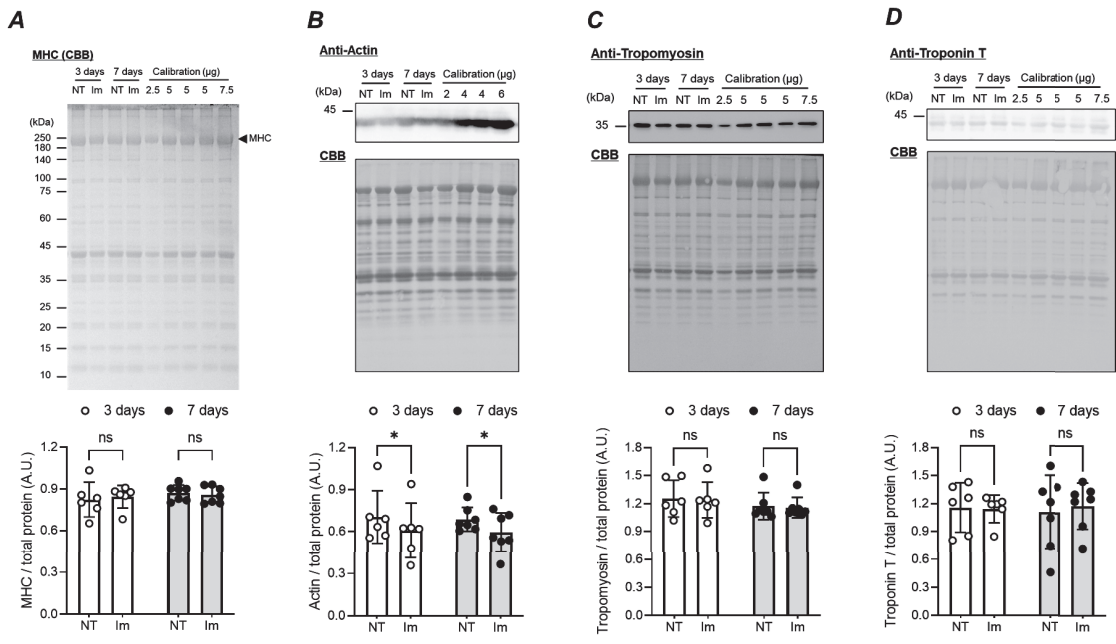


Figure 1. Changes in myofibrillar protein contents in the early phase of immobilization

A, upper panel: Representative image for Coomassie brilliant blue (CBB) staining of gel. Lower panel: Mean ($\pm$ SD) change in myosin heavy chain (MHC) content in gastrocnemius muscle of non-treated (NT) and immobilized (Im) legs after 3 and 7 days of immobilization. The numbers of mice (N) examined was $N = 6$ for NT and $N = 7$ for Im. B-D, upper panel: Representative image of western blotting against anti-Actin (B), anti-Tropomyosin (C) and anti-Troponin T (D). Middle panel: Representative image of CBB staining for membrane after the application of western blotting. Lower panel: mean ($\pm$ SD) change in actin (B), tropomyosin (C) and troponin T (D) contents in gastrocnemius muscle of NT and Im legs after 3 and 7 days of immobilization. N was same as A. * $P < 0.05$ (two-way ANOVA for repeated measure). ns indicates no significant difference.

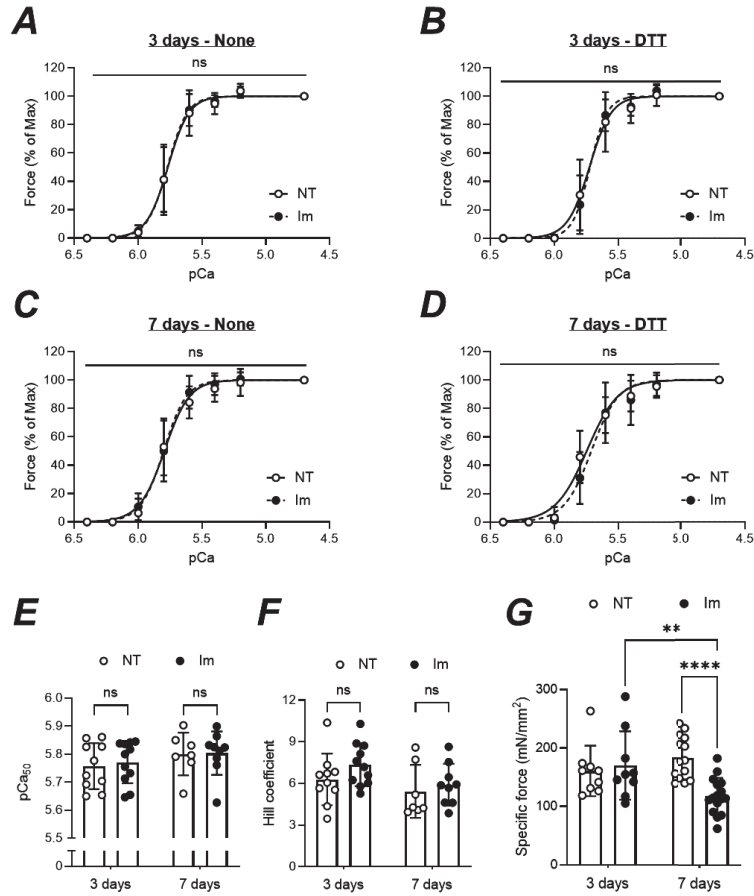


Figure 2. Changes in myofibrillar active force in the early phase of immobilization

Mechanically skinned fibers from superficial region of gastrocnemius muscle were used for measurements for force-pCa relationship and specific force. The sarcomere length was adjusted to $2.8 \mu\text{m}$ in Relax solution by laser diffraction before measurements. *A* and *B*, force-pCa relationship before (*A*) and after (*B*) dithiothreitol (DTT) treatment after 3 days of immobilization. The numbers of mice (*N*) and fibers (*n*) examined were *N* = 5, *n* = 10 for non-treated (NT) fibers and *N* = 5, *n* = 11 for immobilized (Im) fibers. *C* and *D*, force-pCa relationship before (*C*) and after (*D*) DTT treatment after 7 days of immobilization. *N* and *n* were *N* = 2, *n* = 7 for NT fibers and *N* = 3, *n* = 9 for Im fibers. *E*, mean ($\pm$ SD) pCa₅₀ before DTT treatment after 3 days and 7 days of immobilization. *N* and *n* were *N* = 5, *n* = 10 for NT fibers after 3 days of immobilization, *N* = 5, *n* = 11 for Im fibers after 3 days of immobilization, *N* = 2, *n* = 7 for NT fibers after 7 days of immobilization, and *N* = 3, *n* = 9 for Im fibers after 7 days of immobilization. *F*, mean ($\pm$ SD) Hill coefficient before DTT treatment after 3 days and 7 days of immobilization. *N* and *n* were same as *E*. *G*, mean ($\pm$ SD) specific force before DTT treatment after 3 days and 7 days of immobilization. *N* and *n* were *N* = 5, *n* = 9 for NT fibers after 3 days of immobilization, *N* = 5, *n* = 9 for Im fibers after 3 days of immobilization, *N* = 5, *n* = 14 for NT fibers after 7 days of immobilization and *N* = 6, *n* = 16 for Im fibers after 7 days of immobilization. *****P* < 0.0001 (unpaired t-test). ns indicates no significant difference.

筋原線維能動張力

張力-pCa 曲線は不活動 7 日後まで変化しなかった (図 2A, C). pCa₅₀ およびヒル係数についても, 3 日間の不活動化後および 7 日間の不活動化後の両方で, NT 線維と Im 線維の間に差は認められなかった (図 2E, F). 3 日間の不活動化後の pCa₅₀ は NT 線維で 5.76 ± 0.082 , Im 線維で 5.77 ± 0.075 であり, ヒル係数は NT 線維で

6.30 ± 1.86 , Im 線維で 7.34 ± 1.54 であった. 7 日間の不活動化後の pCa₅₀ は NT 線維で 5.80 ± 0.076 , Im 線維で 5.80 ± 0.077 であり, ヒル係数は NT 線維で 5.44 ± 1.92 , Im 線維で 5.92 ± 1.50 であった. DTT 処理後, 不活動化期間にかかわらず, すべての群で張力-pCa 曲線は右方にシフトしたが, DTT 処理後の NT と Im の間には差はなかった (図 2B, D). 固有張力は, 不活動 7 日

後に有意に低下したが (図 2G; NT 185 ± 37.0 mN/mm² vs. Im 119 ± 30.9 mN/mm²; $P < 0.0001$), 3 日後には低下しなかった。

可逆的な酸化修飾が, 不動化 7 日後の固有張力低下に寄与している可能性がある (Dutka et al., 2011; Min et al., 2011; Dutka et al., 2012). DTT は可逆的な酸化修飾を還元できる強力な還元剤である。本研究では, 線維が一度活性化

されると DTT が無効になるという先行研究 (Dutka et al., 2011; Dutka et al., 2012) に基づき, 非活性化線維と活性化線維の 2 つの条件下で DTT の効果を検討した。DTT 処理は, 活性化 Im 線維において減少した固有張力を回復させなかった (処理前の $96.0 \pm 6.41\%$) (図 3A, C)。対照的に, 非活性化 Im 線維の固有張力は DTT 処理により部分的に回復したが (図 3B,

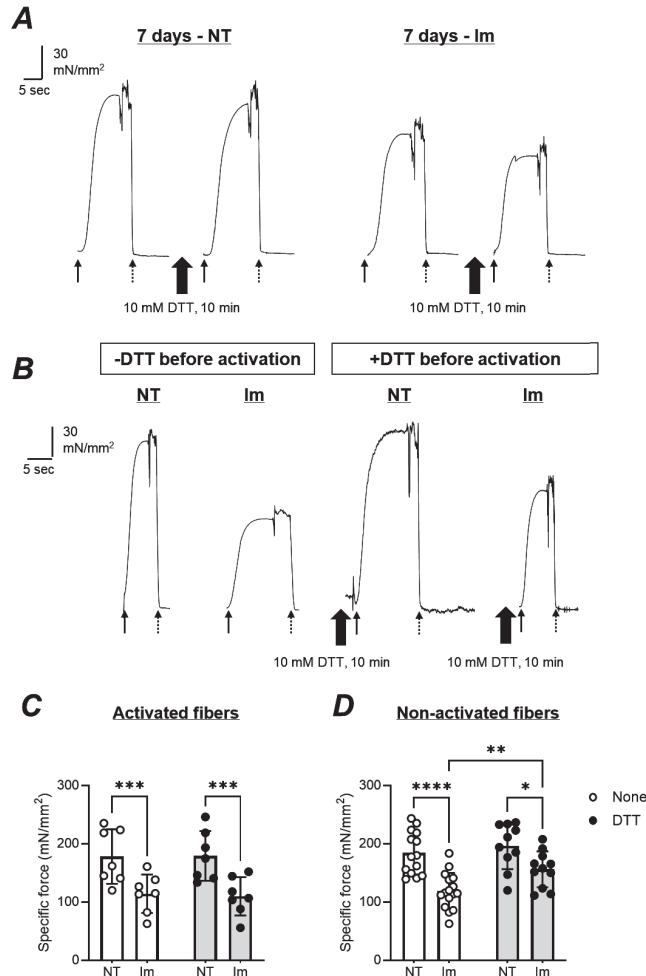


Figure 3. Effects of dithiothreitol (DTT) treatment on specific force after 7 days of immobilization

The sarcomere length of mechanically skinned fiber was adjusted to $2.8 \mu\text{m}$ in Relax solution by laser diffraction before measurements. A, representative force responses in activated fibers from non-treated (NT) and immobilized (Im) gastrocnemius muscles before and after DTT treatment. Fibers were exposed to Max solution (solid arrow) and then to Relax solution if the force reached the plateau (dashed arrow). Thereafter, the fibers were immersed in Relax solution containing 10 mM DTT for 10 min (DTT treatment; black arrow). Then, specific force measurement was repeated. B, representative force responses in non-activated fibers from NT and Im muscles. DTT was treated before measurement of specific force. C, mean ($\pm$ SD) specific force in activated fibers. The numbers of mice (N) and fibers (n) examined were $N = 3, n = 7$ for NT fibers and $N = 3, n = 7$ for Im fibers. D, mean ($\pm$ SD) specific force in non-activated fibers. N and n were $N = 5, n = 14$ for NT fibers without DTT treatment, $N = 6, n = 16$ for Im fibers without DTT treatment, $N = 3, n = 10$ for NT fibers with DTT treatment, and $N = 3, n = 11$ for Im fibers with DTT treatment. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ and $****P < 0.0001$ (two-way ANOVA for repeated measure for C; two-way ANOVA for D).

D; DTT 処置なし 119 ± 30.9 mN/mm² vs. DTT 処置あり 156 ± 30.7 mN/mm²), NT 線維では効果が見られなかった (図 3B, D).

ONOO⁻ は非活性化線維においてのみ Ca²⁺ 活性化最大張力を低下させることが示されているため, 不動化誘発性の張力低下に対する ONOO⁻ の影響を調査した. pH 8.5 単独では影響がなかったが (図 4B), pH 8.5 環境下にて Sin-1 処理を行うと, 最大張力が有意に低下し, その低

下幅は NT 群 ($15.0 \pm 2.18\%$) よりも Im 群 ($22.1 \pm 4.10\%$) で大きかった (図 4C). 非活性化線維において, Sin-1 は NT 群の固有張力を約 40% 有意に低下させたが (図 4D, E), Im 群では固有張力は変化しなかった (図 4D, E).

Sin-1 による副産物 (NO[•] および O₂^{•-}) の影響を除外し ONOO⁻ のみの影響を検討するため, 我々は ONOO⁻ を 1 分間適用した. 処置時間が短い理由は, ONOO⁻ は pH 8.5 溶液条件下で数

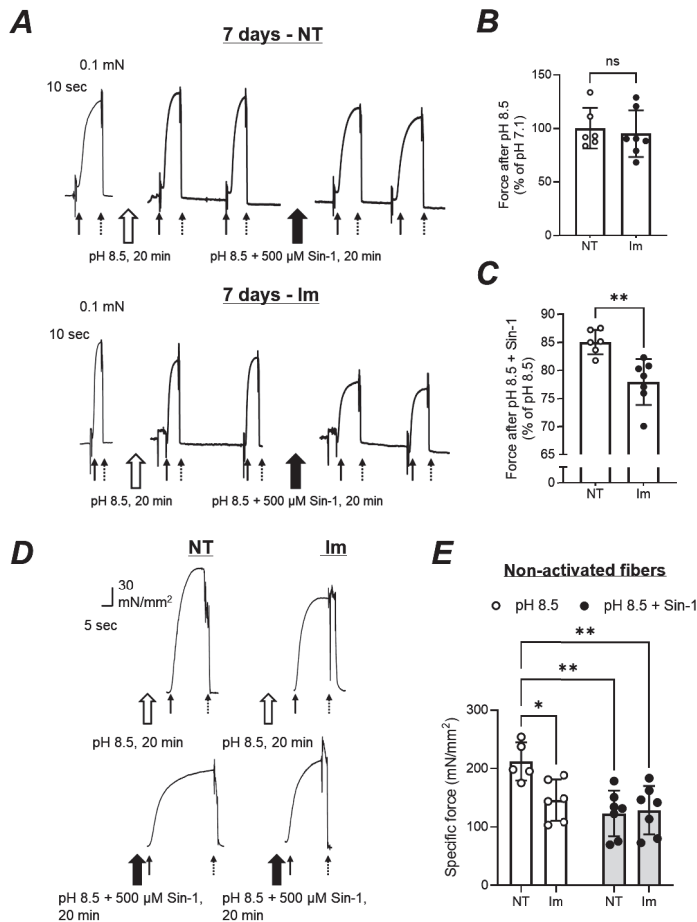


Figure 4. Effects of 3-morpholinosydnonimine (Sin-1) treatment on myofibrillar maximal force after 7 days of immobilization

A, representative examples of Ca²⁺-activated maximal force measurement with 500 μ M Sin-1 treatment at pH 8.5 for 20 min (black arrow) in mechanically skinned fibers from non-treated (NT) and immobilized (Im) muscles after 7 days of immobilization. Before Sin-1 treatment, pH 8.5 effect on Ca²⁺-activated maximal force was examined (open arrow). In each measurement, fibers were exposed to Max solution (solid arrow) and then to Relax solution if the force reached the plateau (dashed arrow). B, mean ($\pm$ SD) changes in Ca²⁺-activated maximal force after only pH 8.5 treatment. The numbers of mice (*N*) and fibers (*n*) examined were *N* = 3, *n* = 6 for NT fibers and *N* = 3, *n* = 7 for Im fibers. C, mean ($\pm$ SD) changes in Ca²⁺-activated maximal force after Sin-1 treatment at pH 8.5. *N* and *n* were same as B. D, representative force responses in non-activated fibers from NT and Im muscles. The Sin-1 treatment at pH 8.5 was conducted before measurement of specific force. E, mean ($\pm$ SD) specific force in non-activated fibers. *N* and *n* were *N* = 2, *n* = 5 for NT fibers without Sin-1 treatment, *N* = 2, *n* = 6 for Im fibers without Sin-1 treatment, *N* = 4, *n* = 7 for NT fibers with Sin-1 treatment, and *N* = 4, *n* = 7 for Im fibers with Sin-1 treatment. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (unpaired t-test for C; two-way ANOVA for E). ns indicates no significant difference.

秒から数十秒という極めて短寿命であるためである。Sin-1の実験と同様に ONOO⁻も活性化線維 (図5A) と非活性化線維 (図5D) に対して処置された。活性化線維では, ONOO⁻はNT線維 ($8.87 \pm 4.58\%$ 減少) と Im 線維 ($9.76 \pm 4.46\%$ 減少) の両方で Ca²⁺ 活性化最大張力を同程度に減少させたが (図5C), pH 8.5 のみでは影響がなかった (図5B)。非活性化線維では

ONOO⁻はNT群の固有張力のみ有意に低下させた (図5D, E; ONOO⁻処置なし 232 ± 16.7 mN/mm² vs. ONOO⁻処置あり 175 ± 46.2 mN/mm²; $P < 0.01$)。一方で, ONOO⁻は非活性化 Im 線維には影響を与えなかった (図5D, E; ONOO⁻処置なし 165 ± 24.1 mN/mm² vs. ONOO⁻処置あり 185 ± 43.5 mN/mm²)。

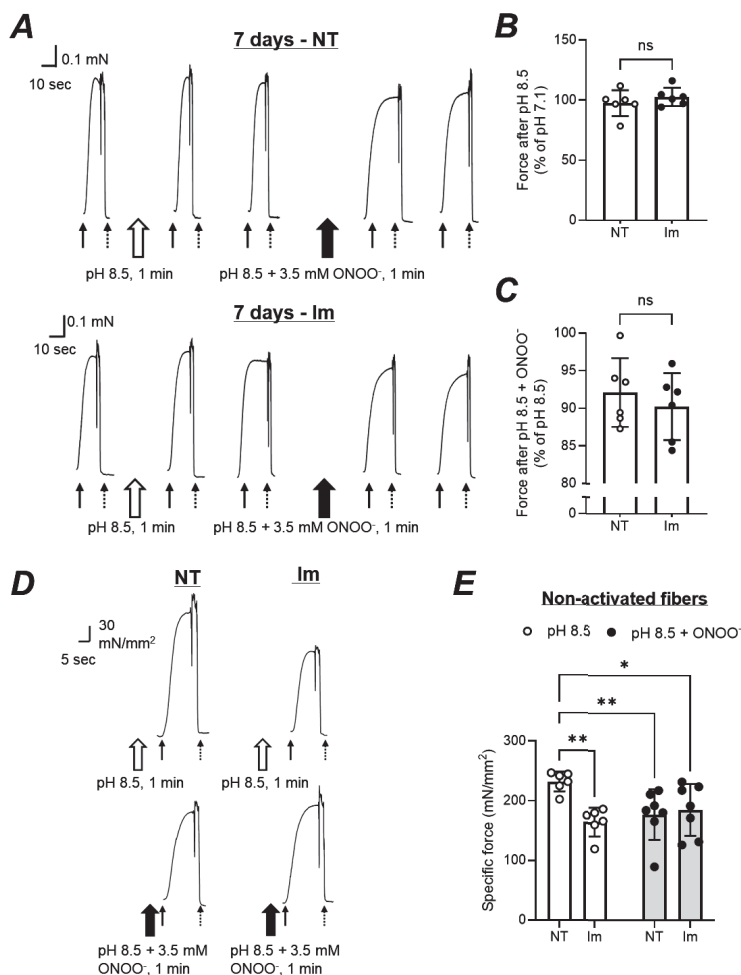


Figure 5. Effects of peroxynitrite (ONOO⁻) treatment on myofibrillar maximal force after 7 days of immobilization

A, representative examples of Ca²⁺-activated maximal force measurement with 3.5 mM ONOO⁻ treatment at pH 8.5 for 1 min (black arrow) in mechanically skinned fibers from non-treated (NT) and immobilized (Im) muscles after 7 days of immobilization. Before ONOO⁻ treatment, pH 8.5 effect on Ca²⁺-activated maximal force was examined (open arrow). In each measurement, fibers were exposed to Max solution (solid arrow) and then to Relax solution if the force reached the plateau (dashed arrow). B, mean ($\pm$ SD) changes in Ca²⁺-activated maximal force after only pH 8.5 treatment. The numbers of mice (*N*) and fibers (*n*) examined were *N* = 3, *n* = 6 for NT fibers and *N* = 3, *n* = 6 for Im fibers. C, mean ($\pm$ SD) changes in Ca²⁺-activated maximal force after ONOO⁻ treatment at pH 8.5. *N* and *n* were same as B. D, representative force responses in non-activated fibers from NT and Im muscles. The ONOO⁻ treatment at pH 8.5 was conducted before measurement of specific force. E, mean ($\pm$ SD) specific force in non-activated fibers. *N* and *n* were *N* = 3, *n* = 6 for NT fibers without ONOO⁻ treatment, *N* = 3, *n* = 6 for Im fibers without ONOO⁻ treatment, *N* = 2, *n* = 7 for NT fibers with ONOO⁻ treatment, and *N* = 2, *n* = 7 for Im fibers with ONOO⁻ treatment. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (two-way ANOVA). ns indicates no significant difference.

筋原線維受動張力

受動張力 - 長さ関係は不活動化7日後から低下し始めた(図6D; SL 3.6 μm において NT 43.9 $\pm$ 18.5 mN/mm² vs. Im 21.5 $\pm$ 10.7 mN/mm²). DTT 処理は検討したすべての群で受動張力 - 長さ関係を上方にシフトさせたが(図6), その効果は不活動化7日後の Im 線維でより顕著であった(図6F). 実際に, DTT 処理は不活動化7日後の Im 線維における SL 3.6 μm での受動張力を 185 $\pm$ 66.0%に増加させ, これは NT 線維の 139 $\pm$ 25.8%の増加よりも有意に高かった ($P < 0.05$).

スキンドファイバーにおいて, 受動張力は主にタイチンの弾性によって決定される. タイチンの Ig ドメインの S- グルタチオン化は弾性を低下させることが知られており (Linke, 2018; Watanabe et al., 2020), これは伸展中に高濃度の GSSG に曝露することで生じる (Alegre-Cebollada et al., 2014; Watanabe et al., 2020).

NT 線維では, 伸展中の高濃度 GSSG (20 mM) 曝露により受動張力が低下し (SL 3.6 μm で約 25% 低下; $P < 0.05$), その後の DTT 処理によって回復した (図7A, B, D). 対照的に, Im 線維では GSSG 処理後の受動張力の低下はわずかであり (SL 3.6 μm で約 8% 低下; $P < 0.05$), その後の DTT 処理は未処理状態と比較して受動張力を約 39% も増大させる過剰な回復をもたらした (図7A, C, E; $P < 0.05$). さらに, GSSG 処理後の受動張力の低下率は, Im 線維よりも NT 線維の方が大きかった (図7F; $P < 0.05$).

線維タイプの影響

SDS-PAGE により大半の線維のタイプを特定したところ, ほほすべての線維がタイプ IIb であった (図8A). 不活動化7日後のプールされたデータからタイプ IIb 線維のみに限定して解析を行っても, 全線維を対象とした場合と同一の結果が得られた. 具体的には, Im 線維で固

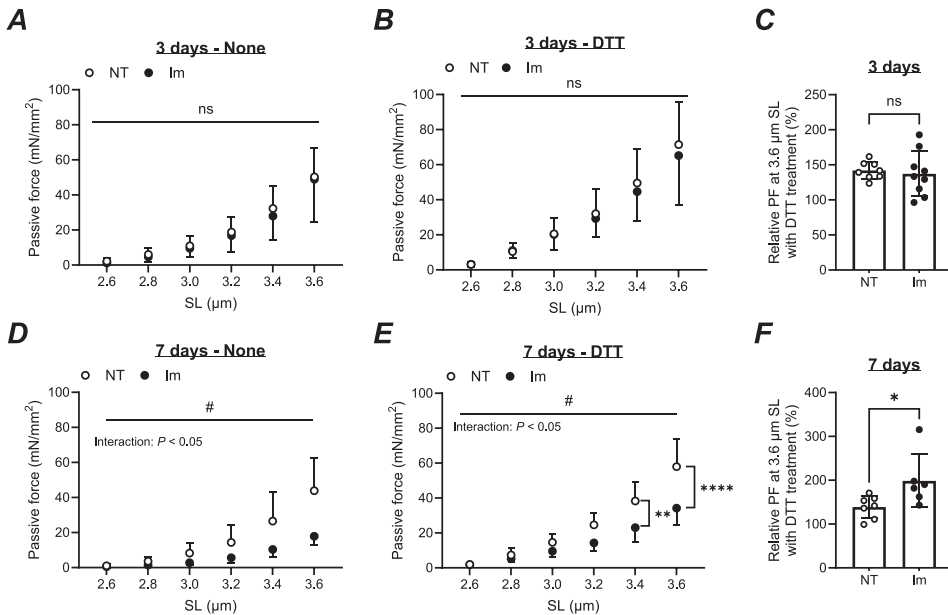


Figure 6. Changes in myofibrillar passive force (PF) in the early phase of immobilization

PFs were measured at various sarcomere length (SL; 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4 and 3.6 μm) before and after dithiothreitol (DTT) treatment (10 mM for 10 min). A and B, passive force-length relationship without (A) and with (B) DTT treatment after 3 days of immobilization. The numbers of mice (N) and fibers (n) examined were $N = 5$, $n = 8$ for non-treated (NT) fibers and $N = 4$, $n = 9$ for immobilized (Im) fibers. C, mean ($\pm$ SD) change after DTT treatment after 3 days of immobilization. N and n were same as A and B. D and E, passive force-length relationship without (D) and with (E) DTT treatment after 7 days of immobilization. N and n were $N = 2$, $n = 7$ for NT fibers and $N = 3$, $n = 6$ for Im fibers. F, mean ($\pm$ SD) change after DTT treatment after 7 days of immobilization. N and n were same as D and E. # $P < 0.05$ (main effect, two-way ANOVA for repeated measure). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ (unpaired t-test for F; two-way ANOVA for repeated measure for D and E). ns indicates no significant difference.

有張力が有意に低下し（図 8B）, Sin-1 および ONOO⁻ 処理による固有張力の変化には有意な交互作用（不動化 × 処理）が認められた（図

8C, D). また, 受動張力も Im 線維で有意に低かった（図 8E).

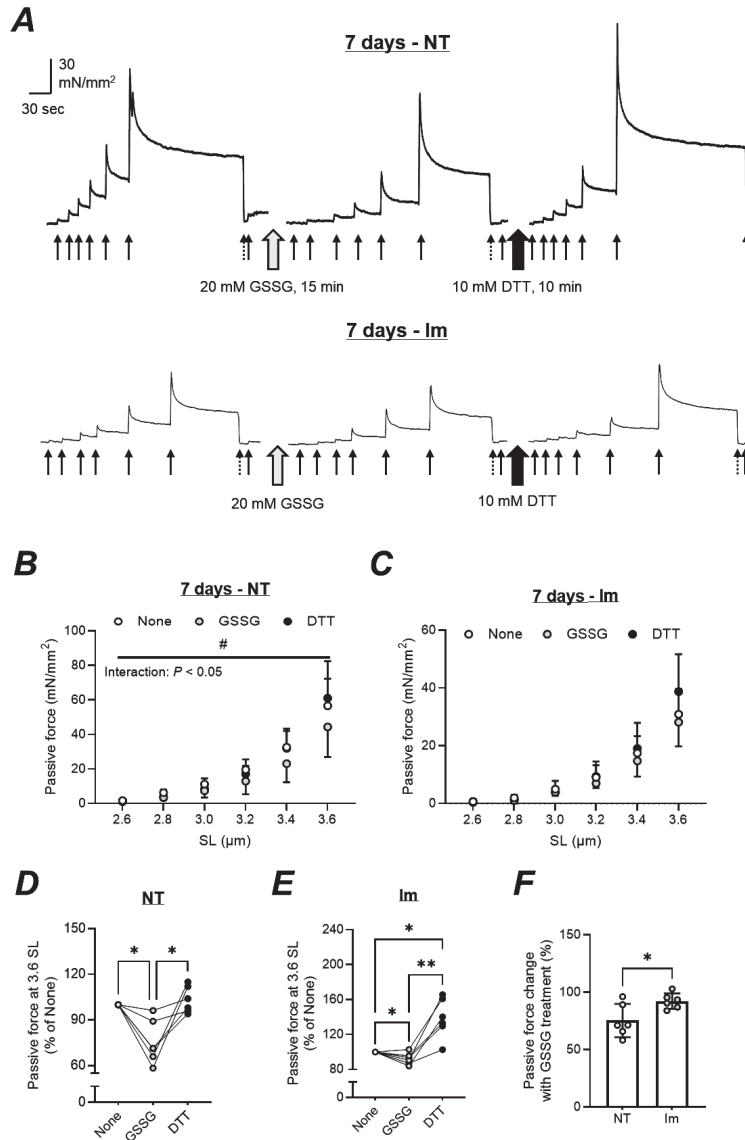


Figure 7. Effects of S-glutathionylation on passive force after 7 days of immobilization

A, representative examples of passive force measurement with 20 mM oxidized glutathione (GSSG) treatment for 15 min (grey arrow) and subsequent 10 mM dithiothreitol (DTT) treatment for 10 min (black arrow) in mechanically skinned fibers from non-treated (NT) and immobilized (Im) muscles after 7 days of immobilization. Solid arrows indicate progressive stretch of the fibers from 2.6 to 3.6 μ m sarcomere length (SL). After measurement of passive force at 3.6 μ m SL, the fiber was slacked (dashed arrow), then PF at 2.8 μ m SL was measured again. GSSG and DTT were applied at 3.6 μ m SL. B and C, passive force-length relationship with GSSG and DTT treatments in NT (B) and Im (C) fibers after 7 days of immobilization. The numbers of mice (N) and fibers (n) examined were $N = 3, n = 6$ for NT fibers and $N = 3, n = 6$ for Im fibers. D and E, percent changes in passive force at 3.6 μ m SL with GSSG and DTT treatments in NT (D) and Im (E) fibers. N and n were same as B and C. F, mean ($\pm$ SD) change after GSSG treatment. N and n were same as B and C. # $P < 0.05$ (main effect, two-way ANOVA for repeated measure). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (unpaired t-test for F; one-way ANOVA for repeated measure for D and E). ns indicates no significant difference.

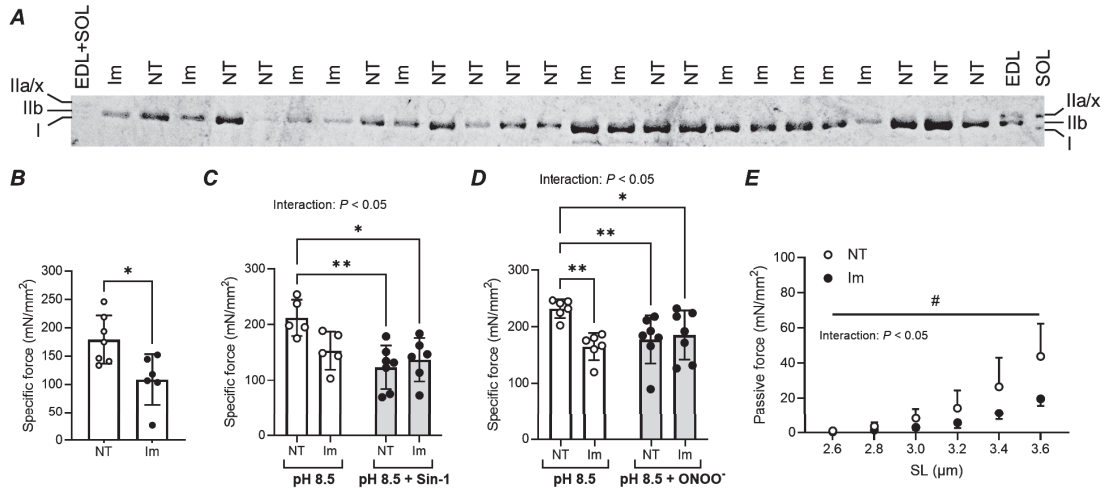


Figure 8. Changes in active and passive forces in type IIb fibers after 7 days of immobilization

A, representative gel image of fiber type determination. **B**, mean ($\pm$ SD) specific force of non-treated (NT) and immobilized (Im) type IIb fibers after 7 days of immobilization. The numbers of mice (N) and fibers (n) examined were $N = 2, n = 7$ for NT fibers and $N = 2, n = 6$ for Im fibers. **C**, effects of 3-morpholinosydnonimine (Sin-1) treatment on specific force of NT and Im type IIb fibers after 7 days of immobilization. N and n were $N = 2, n = 5$ for NT fibers without Sin-1 treatment, $N = 2, n = 5$ for Im fibers without Sin-1 treatment, $N = 4, n = 7$ for NT fibers with Sin-1 treatment, and $N = 4, n = 6$ for Im fibers with Sin-1 treatment. **D**, effects of peroxynitrite (ONOO^-) treatment on specific force of NT and Im type IIb fibers after 7 days of immobilization. N and n were $N = 3, n = 6$ for NT fibers without ONOO^- treatment, $N = 3, n = 6$ for Im fibers without ONOO^- treatment, $N = 2, n = 7$ for NT fibers with ONOO^- treatment, and $N = 2, n = 7$ for Im fibers with ONOO^- treatment. **E**, passive force-length relationship after 7 days of immobilization in NT and Im type IIb fibers. N and n were $N = 2, n = 7$ for NT fibers and $N = 2, n = 4$ for Im fibers. # $P < 0.05$ (main effect, two-way ANOVA for repeated measure). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (unpaired t -test for **B**; two-way ANOVA for **C** and **D**).

IV. 考察

本研究では、3日間および7日間不活動化した筋から得られたメカニカルスキンドファイバーを用い、不活動の初期段階における可逆的な酸化修飾が筋原線維の機能にどのように影響するかを検討した。本研究の結果は、可逆的な酸化修飾が不活動初期の筋原線維の収縮不全に寄与することを示唆する。我々は、7日間の不活動化後において、1) 低下した固有張力がDTT処理によって部分的に回復すること、2) SL 3.6 μm における受動的張力がDTT処理後にNT線維よりもIm線維でより顕著に増加することを観察した。さらに、7日間の不活動化後、1) ONOO^- およびSin-1処理による固有張力の低下はIm線維よりもNT線維で大きく、2) GSSG処理による受動的張力の低下もIm線維よりもNT線維で大きかった。これらの結果は、不活動の初期段階における能動的張力の低下には ONOO^- による修飾が、受動的張力の低下にはS-グルタチオン化が重要な役割を果たして

いることを示唆する。

不活動初期における筋原線維の能動的張力に対する可逆的酸化修飾の影響

先行研究では、ヒトおよびラットにおいて、数週間の不活動後に筋原線維の固有張力が低下することが示されている (Larsson et al., 1996; Udaka et al., 2008; Brocca et al., 2015; Lamboley et al., 2016)。この固有張力の低下は、ミオシンフィラメントやアクチンフィラメントの短縮といったサルコメア構造の異常 (Udaka et al., 2008) や筋原線維タンパク質の減少 (Brocca et al., 2015) に起因する、クロスブリッジの障害によるものと考えられている。本研究では、不活動の初期段階においてアクチン含有量の減少を観察しており、これが初期の張力低下の一因となる可能性がある。このアクチン含有量の減少は、ヒトにおいて不活動後最初の7日間筋原線維タンパク質の合成速度が低下するという報告 (Kilroe et al., 2020) と一致する。Broccaら

(2015) は、ヒトにおいて14日間の不動化後、MHCおよびトロポニンT含有量の有意な減少、ならびにトロポミオシンおよびアクチン含有量の減少傾向を示した (Brocca et al., 2015). このことは、不動化が2週間を超えると、筋原線維タンパク質含有量の減少が張力低下の主な原因となる可能性を示唆している。

不動化後の固有張力の低下は、これまで「サルコメア構造の異常」と「タンパク質量の減少」という2つの要因で説明されることが多かった。しかし、不動化中には酸化ストレスが増大することが知られているため (Powers et al., 2005; Hyatt et al., 2019), 酸化的修飾もこの張力低下に関与している可能性があった。本研究では、DTT 処理が非活性化線維において固有張力を部分的に回復させたが、活性化線維では回復させなかった。興味深いことに、先行研究でもDTTは酸化による固有張力の低下を回復させるが、それは非活性化線維に限られることが示されている (Dutka et al., 2011; Dutka et al., 2012). 活性化線維でDTTが張力を回復できない正確な理由は不明だが、収縮によってミオシンと隣接するタンパク質との間に不可逆的な架橋構造が形成されるか、あるいは活性化によって酸化されたミオシン頭部の構造が崩壊する可能性が示唆されている (Dutka et al., 2011).

固有張力は低下したが、不動化初期において張力-pCa 曲線 (Ca^{2+} 感受性) は変化しなかった。このパターン (Ca^{2+} 感受性の変化を伴わない固有張力の低下) は、筋原線維に対するONOO⁻の影響に関する先行研究の結果 (Dutka et al., 2011) と一致する。DTTはONOO⁻による固有張力の低下を部分的に回復させたが、それも本研究の結果と同様に非活性化線維のみであった (Dutka et al., 2011). Sin-1 およびONOO⁻の影響を検討した本研究の結果もこの考えを支持している。すなわち、Sin-1 またはONOO⁻処理はNT群の非活性化線維の固有張力を低下させたがIm群では低下させなかった。さらに、先行研究では、不活動筋においてNO[•]およびO₂^{•-}の産生が有意に増加することが示されている (Suzuki et al., 2007; Min et al., 2011; Powers

et al., 2011). これらを統合すると、不動化初期の筋原線維の能動的張力の低下には、ONOO⁻が寄与する可能性が高い。

活性化線維においては、Sin-1 処理はNT線維と比較してIm線維でより大きな筋原線維最大張力の低下をもたらしたが、ONOO⁻処理は両群で同程度の低下を引き起こした。このことは、不動化後の筋ではONOO⁻以外のRONSに対する感受性が高まることを示唆している。Sin-1 は、まずNO[•]とO₂^{•-}を生成するため、NO[•]とO₂^{•-}が寄与する可能性が高い。NO[•]は一般に最大強縮張力の低下とは関連しないが (Kumar et al., 2022), O₂^{•-}は筋原線維の最大張力を低下させることが示されている (Darnley et al., 2001; van der Poel and Stephenson, 2002; van der Poel et al., 2007; van der Poel and Stephenson, 2007). O₂^{•-}の大部分はNO[•]と急速に反応してONOO⁻を形成すると考えられているが (Goldstein and Czapski, 1995; Botti et al., 2010; Cheng et al., 2016), 一部のO₂^{•-}は過酸化水素やヒドロキシラジカルに変換される可能性がある。これらのうち、ヒドロキシラジカルは筋原線維の最大張力を損なうことが示されているが (Murphy et al., 2008), 過酸化水素には有意な影響はない (Lamb and Posterino, 2003). 要約すると、不動化はRONS (特にO₂^{•-}とヒドロキシラジカル) に対する筋原線維の感受性を高めるようである。これが、酸化ストレスレベルがNT線維と同程度であっても、Im線維において機能障害が引き起こされる要因となっている可能性がある。

不動化中にはタイプIからタイプIIへの筋線維タイプが移行することが報告されており (Jaweed et al., 1975), 本研究で観察されたNT線維とIm線維の差が線維タイプの違いによるものである可能性が考えられた。これを検証するため、SDS-PAGEにより線維タイプを特定した。本研究で検討したファイバーのほとんどはタイプIIbであり、タイプIIb線維のみに限定した分析でも、全線維のデータと同様の結論が得られた。したがって、線維タイプの違いが本研究の知見に影響を与えた可能性は低い。

不活動初期における筋原線維の受動的張力に対する可逆的酸化修飾の影響

同じサルコメア長において受動的張力は能動的張力よりもはるかに低いため、筋原線維の弾性は骨格筋の能動的張力発生にほとんど影響しないと考えられてきた。しかしながら、近年の研究では、受動的張力が実際に能動的張力の発生に寄与する可能性が示唆されている。例えば、タイチンの部分的な分解後に能動的張力が低下すること (Joumaa et al., 2018) や、伸張が筋原線維の Ca^{2+} 感受性を高めること (Linke, 2018) が示されている。Im 線維において受動的張力が著しく (約 50%) 低下したことを考慮すると、不活動による能動的張力の低下は、部分的に受動的張力の低下に起因する可能性がある。

不活動 7 日後、スキンドファイバーの受動的張力は低下しており、これはスキンドファイバーにおける弾性の主要な決定因子であるタイチンの弾性が低下したことを示唆する (Prado et al., 2005; Udaka et al., 2008; Watanabe et al., 2020)。本研究では、7 日間の不活動後に以下の知見が得られた。1) DTT 処理は NT 線維よりも Im 線維において受動的張力をより大きく増加させた。2) S-グルタチオン化を促進する GSSG 処理は、Im 線維よりも NT 線維において受動的張力のより大きな低下をもたらした。3) GSSG 処理後の DTT 処理は、Im 線維の受動的張力を処理前のレベル以上に回復させた。これらの結果は、不活動初期における受動的張力の低下が、少なくとも部分的にはタイチンの S-グルタチオン化に起因することを示唆している。

注目すべきは、不活動後の受動的張力低下に対する可逆的酸化修飾の寄与は部分的であるように見える点である。DTT 処理後であっても、Im 線維の受動的張力は NT 線維よりも低いままであった。このことは、タイチンの分解やタイチンのリン酸化状態の変化といった、他のメカニズムが関与している可能性を示唆している (Udaka et al., 2008; Linke and Kruger, 2010)。タイチンの分解は 6 週間の不活動 (Udaka et

al., 2008) やヒラメ筋における 3 日間 (Goto et al., 2003) および 14 日間 (Yeo and Lim, 2023) の後肢懸垂など、様々な不活動条件下で広く観察されている。例えば、Udaka ら (2008) は、6 週間の不活動後のヒラメ筋においてタイチンの分解を示した (Udaka et al., 2008)。スキンドファイバーを伸張中に μM レベルの細胞質 Ca^{2+} に曝露すると受動的張力が低下するが、これは μM レベルの Ca^{2+} によって活性化されるアイソフォームであるカルパイン-1 の活性化による可能性が高い (Murphy et al., 2006; Murphy, 2010)。カルパイン-1 は、重度の萎縮状態に関連する高濃度の過酸化水素によっても活性化される (McClung et al., 2009)。したがって、カルパイン-1 によるタイチンの分解も Im 線維における受動的張力-長さ関係の低下に寄与する別の要因である可能性がある。さらに、リン酸化はタイチンの弾性を決定する上で重要な役割を果たす。不活動中のタイチンのリン酸化状態は依然として不明であるが、筋疲労の初期段階においてタイチンがプロテインキナーゼ Ca によってリン酸化されることが報告されており (Shi et al., 2021)、リン酸化状態が短期間で変化する可能性が示唆される。不活動に伴う受動的張力-長さ関係の低下の基礎となるメカニズムを完全に解明するには、今後さらなる研究が必要である。

不活動に伴う機能低下を軽減するための臨床介入への示唆

本研究は、抗酸化剤が不活動中、特にその初期段階において、筋力低下を緩和できる可能性があることを示唆している。具体的には、L-NAME などの RNS 阻害剤が不活動中の筋原線維機能に有益な効果を及ぼす可能性がある。不活動時の筋萎縮に対する抗酸化剤の影響を調べた研究は数多くあるが (Powers, 2014)、筋機能に対する影響についてはまだ明確ではない。しかし、結果はいくぶん複雑であり、抗酸化剤が不活動時の筋萎縮を予防できるという考えを支持する証拠と反対する証拠の両方が存在する (Powers, 2014)。その中で、ミトコンド

リア標的抗酸化剤であるSS-31を用いることが、不活動下での筋量の減少の予防に役立つ可能性を示している (Powers, 2014)。急性のRONSは張力発生に対して二相性の影響を及ぼすことが広く知られている。すなわち、低レベルのRONSは筋力を増大させ、重度の酸化ストレスは筋力を低下させる。したがって、不動化中の筋収縮力に対する抗酸化剤の影響は、不動化の期間、用量、および使用される抗酸化剤の種類などの要因によって異なる可能性が高い。これらの変数を探索し、不動化中の筋力低下を予防するための効果的な戦略を開発するには、さらなる研究が必要である。

臨床的な観点から、不動化に起因する筋原線維の機能不全は、重症疾患ミオパチー (CIM) (Shi et al., 2019; Swist et al., 2020) に関連している可能性がある。CIMは、長期的な人工呼吸器管理を受けている患者に見られる筋力低下を特徴とする病態であり、横隔膜の活動が低下する。CIMは横隔膜だけでなく末梢の筋の急速な萎縮と機能障害を引き起こす。興味深いことに、CIM患者の前脛骨筋では、アクチン含有量に対するタイチンの発現が減少している (Swist et al., 2020)。しかし、本研究の知見はいくつかの点でCIMの知見とは異なっている。CIM患者では、アクチンフィラメントよりも、ミオシンフィラメントのタンパク質 (例: MHCやタイチン) が優先的に消失する (Friedrich et al., 2018)。対照的に、本研究で調べた不動化筋ではMHC含有量ではなくアクチン含有量が有意に減少しており、これはCIMで見られるパターンとは逆である。したがって、これら2つの病態が同一である可能性は低い。我々の結果はCIMに対する洞察を与える可能性がある。

V. 結論

本研究は、少なくとも不動化の初期段階において、可逆的な酸化修飾が筋原線維の能動的および受動的張力の低下に部分的に寄与していることを示した。筋の不活動によって引き起こされる機能障害は、怪我の回復期、寝たきり、宇

宙飛行などの不動化において重大な懸念事項である。したがって、不活動に起因する障害を予防するための効果的な介入が不可欠である。本研究は、抗酸化剤、特にRNSを標的とするものが、不動化された筋に対して有益な効果をもたらす可能性を示唆している。しかし、不動化の期間、用量、抗酸化剤の種類などの要因を慎重に考慮する必要がある。

利益相反

本研究に関して申告すべき利益相反はない。

脚注

本論文はアメリカ生理学会誌 (細胞生理学) の二次出版論文である (Watanabe et al. 2025 *Am J Physiol-Cell Physiol* 329: C939–C952, DOI: 10.1152/ajpcell.00554.2025)。

謝辞

本研究は、科学研究費助成金 基盤研究B (23K24738, 代表: 渡邊大輝), 国際共同研究加速基金 (23KK0297, 代表: 渡邊大輝), 科学研究費助成金 基盤研究C (24K14496, 代表: 浜田拓), および大阪体育学会研究助成 (代表: 渡邊大輝) の助成を受けたものである。

VI. 参考文献

- Alegre-Cebollada J, Kosuri P, Giganti D, Eckles E, Rivas-Pardo JA, Hamdani N, Warren CM, Solaro RJ, Linke WA & Fernandez JM (2014) S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*, 156: 1235–1246.
- Andrade FH, Reid MB, Allen DG & Westerblad H (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *The Journal of Physiology*, 509: 565–575.
- Beckman JS & Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271: C1424–

1437.

- Bortolotto SK, Cellini M, Stephenson DG & Stephenson GM (2000) MHC isoform composition and Ca^{2+} - or Sr^{2+} -activation properties of rat skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279: C1564–1577.
- Botti H, Moller MN, Steinmann D, Nauser T, Koppenol WH, Denicola A & Radi R (2010) Distance-dependent diffusion-controlled reaction of $\bullet\text{NO}$ and $\text{O}_2\bullet^-$ at chemical equilibrium with ONOO. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114: 16584–16593.
- Brocca L, Longa E, Cannavino J, Seynnes O, de Vito G, McPhee J, Narici M, Pellegrino MA & Bottinelli R (2015) Human skeletal muscle fibre contractile properties and proteomic profile: adaptations to 3 weeks of unilateral lower limb suspension and active recovery. *The Journal of Physiology*, 593: 5361–5385.
- Cheng AJ, Yamada T, Rassier DE, Andersson DC, Westerblad H & Lanner JT (2016) Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *The Journal of Physiology*, 594: 5149–5160.
- Darnley GM, Duke AM, Steele DS & MacFarlane NG (2001) Effects of reactive oxygen species on aspects of excitation-contraction coupling in chemically skinned rabbit diaphragm muscle fibres. *Experimental Physiology*, 86: 161–168.
- Dutka TL, Mollica JP & Lamb GD (2011) Differential effects of peroxynitrite on contractile protein properties in fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers of rat. *Journal of Applied Physiology*, 110: 705–716.
- Dutka TL, Mollica JP, Lambolley CR, Weerakkody VC, Greening DW, Posterino GS, Murphy RM & Lamb GD (2017) S-nitrosylation and S-glutathionylation of Cys134 on troponin I have opposing competitive actions on Ca^{2+} sensitivity in rat fast-twitch muscle fibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312: C316–C327.
- Dutka TL, Verburg E, Larkins N, Hortemo KH, Lunde PK, Sejersted OM & Lamb GD (2012) ROS-mediated decline in maximum Ca^{2+} -activated force in rat skeletal muscle fibers following in vitro and in vivo stimulation. *PloS one*, 7: e35226.
- Friedrich O, Diermeier S & Larsson L (2018) Weak by the machines: muscle motor protein dysfunction - a side effect of intensive care unit treatment. *Acta Physiologica*, 222.
- Goldstein S & Czapski G (1995) The reaction of NO. with O_2^- and HO_2^- : a pulse radiolysis study. *Free Radical and Biology Medicine*, 19: 505–510.
- Goto K, Okuyama R, Honda M, Uchida H, Akema T, Ohira Y & Yoshioka T (2003) Profiles of connectin (titin) in atrophied soleus muscle induced by unloading of rats. *Journal of Applied Physiology*, 94: 897–902.
- Hyatt H, Deminice R, Yoshihara T & Powers SK (2019) Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 662: 49–60.
- Jaweed MM, Herbison GJ & Ditunno JF (1975) Denervation and reinnervation of fast and slow muscles. A histochemical study in rats. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 23: 808–827.
- Joumaa V, Bertrand F, Liu S, Poscente S & Herzog W (2018) Does partial titin degradation affect sarcomere length nonuniformities and force in active and passive myofibrils? *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315: C310–C318.
- Kilroe SP, Fulford J, Holwerda AM, Jackman

- SR, Lee BP, Gijzen AP, van Loon LJC & Wall BT (2020) Short-term muscle disuse induces a rapid and sustained decline in daily myofibrillar protein synthesis rates. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 318: E117-E130.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H & Beckman JS (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 834-842.
- Kumar R, Coggan AR & Ferreira LF (2022) Nitric oxide and skeletal muscle contractile function. *Nitric Oxide*, 122-123: 54-61.
- Lamb GD (2002) Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23: 81-91.
- Lamb GD & Posterino GS (2003) Effects of oxidation and reduction on contractile function in skeletal muscle fibres of the rat. *The Journal of Physiology*, 546: 149-163.
- Lamb GD & Stephenson DG (2018) Measurement of force and calcium release using mechanically skinned fibers from mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 125: 1105-1127.
- Lambole CR, Wyckelsma VL, Perry BD, McKenna MJ & Lamb GD (2016) Effect of 23-day muscle disuse on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ properties and contractility in human type I and type II skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*, 121: 483-492.
- Larsson L, Li X, Berg HE & Frontera WR (1996) Effects of removal of weight-bearing function on contractility and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 432: 320-328.
- Linke WA (2018) Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annual Review of Physiology*, 80: 389-411.
- Linke WA & Kruger M (2010) The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology (Bethesda)*, 25: 186-198.
- Maruyama K, Natori R & Nonomura Y (1976) New elastic protein from muscle. *Nature*, 262: 58-60.
- McClung JM, Judge AR, Talbert EE & Powers SK (2009) Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296: C363-371.
- Min K, Kwon OS, Smuder AJ, Wiggs MP, Sollanek KJ, Christou DD, Yoo JK, Hwang MH, Szeto HH, Kavazis AN & Powers SK (2015) Increased mitochondrial emission of reactive oxygen species and calpain activation are required for doxorubicin-induced cardiac and skeletal muscle myopathy. *The Journal of Physiology*, 593: 2017-2036.
- Min K, Smuder AJ, Kwon OS, Kavazis AN, Szeto HH & Powers SK (2011) Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 111: 1459-1466.
- Moiescu DG & Thieleczek R (1978) Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution. *The Journal of Physiology*, 275: 241-262.
- Mollica JP, Dutka TL, Merry TL, Lambole CR, McConell GK, McKenna MJ, Murphy RM & Lamb GD (2012) S-glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans. *The Journal of Physiology*, 590: 1443-1463.
- Murphy RM (2010) Calpains, skeletal muscle

- function and exercise. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*, 37: 385–391.
- Murphy RM, Dutka TL & Lamb GD (2008) Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 586: 2203–2216.
- Murphy RM, Verburg E & Lamb GD (2006) Ca^{2+} activation of diffusible and bound pools of mu-calpain in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 576: 595–612.
- Powers SK (2014) Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? *Sports Medicine*, 44 Suppl 2: S155–165.
- Powers SK, Kavazis AN & DeRuisseau KC (2005) Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: R337–344.
- Powers SK, Talbert EE & Adhihetty PJ (2011) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 589: 2129–2138.
- Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Kruger M, Opitz CA & Linke WA (2005) Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *The Journal of General physiology*, 126: 461–480.
- Rivas-Pardo JA, Eckels EC, Popa I, Kosuri P, Linke WA & Fernandez JM (2016) Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction. *Cell Report*, 14: 1339–1347.
- Shi J, Watanabe D & Wada M (2021) Effects of vigorous isometric muscle contraction on titin stiffness-related contractile properties in rat fast-twitch muscles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 321: R858–R868.
- Shi ZH, Jonkman A, de Vries H, Jansen D, Ottenheijm C, Girbes A, Spoelstra-de Man A, Zhou JX, Brochard L & Heunks L (2019) Expiratory muscle dysfunction in critically ill patients: towards improved understanding. *Intensive Care Medicine*, 45: 1061–1071.
- Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S (2007) NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 2468–2476.
- Swist S, Unger A, Li Y, Voge A, von Frieling-Salewsky M, Skarlen A, Cacciani N, Braun T, Larsson L & Linke WA (2020) Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin. *Nature communications*, 11: 4479.
- Tiago T, Simao S, Aureliano M, Martin-Romero FJ & Gutierrez-Merino C (2006) Inhibition of skeletal muscle S1-myosin ATPase by peroxynitrite. *Biochemistry*, 45: 3794–3804.
- Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S & Fukuda N (2008) Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *The Journal of General physiology*, 131: 33–41.
- van der Poel C, Edwards JN, Macdonald WA & Stephenson DG (2007) Mitochondrial superoxide production in skeletal muscle fibers of the rat and decreased fiber excitability. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292: C1353–1360.
- van der Poel C & Stephenson DG (2002) Reversible changes in Ca^{2+} -activation properties of rat skeletal muscle exposed to elevated physiological temperatures. *The Journal of Physiology*, 544: 765–776.
- van der Poel C & Stephenson DG (2007) Effects of elevated physiological temperatures

- on sarcoplasmic reticulum function in mechanically skinned muscle fibers of the rat. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293: C133–141.
- Wada M, Inashima S, Yamada T & Matsunaga S (2003) Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *Journal of Applied Physiology*, 94: 923–929.
- Wang K, McClure J & Tu A (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 3698–3702.
- Watanabe D, Dutka TL, Lambole CR & Lamb GD (2019) Skeletal muscle fibre swelling contributes to force depression in rats and humans: a mechanically-skinned fibre study. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 40: 343–351.
- Watanabe D, Lambole CR & Lamb GD (2020) Effects of S-glutathionylation on the passive force-length relationship in skeletal muscle fibres of rats and humans. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 41: 239–250.
- Watanabe D, Mishima T & Hamada T (2025) Reversible oxidative modifications partially cause myofibrillar active and passive force decline in early phase of immobilization. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 329: C939–C952.
- Watanabe D, Nishi M, Liu F, Bian Y & Takeshima H (2024) Ca^{2+} storage function is altered in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle lacking mitsugumin 23. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 326: C795–C809.
- Watanabe D & Wada M (2025) Cellular mechanisms underlying overreaching in skeletal muscle following excessive high-intensity interval training. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 328: C921–C938.
- Yeo HS & Lim JY (2023) Effects of exercise prehabilitation on muscle atrophy and contractile properties in hindlimb-unloaded rats. *Muscle and Nerve*, 68: 886–893.
- You JS, Anderson GB, Dooley MS & Hornberger TA (2015) The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Disease Model and Mechanisms*, 8: 1059–1069.

(受付日 2026/06/03 受理日 2026/06/30)