

ラット腓腹筋外側部単一筋線維の  
ミオシン重鎖アイソフォーム構成に及ぼす自発走の影響

辻 本 尚 弥   平 野 朋 枝   鈴 木 英 樹   春 日 規 克

久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要 第11巻 2003年12月 別冊

Reprinted from

The Institute of Health & Sports Science

Vol. 11, December, 2003

=原 著 =

## ラット腓腹筋外側部単一筋線維の ミオシン重鎖アイソフォーム構成に及ぼす自発走の影響

辻本 尚 弥<sup>1</sup> 平野 朋 枝<sup>2</sup> 鈴木 英 樹<sup>3</sup> 春日 規 克<sup>3</sup>

### Effects of Voluntary Wheel Running Training on Myosin Heavy Chain Isoform Composition in Single Fiber from Superficial Portion of Rat Lateral Gastrocnemius Muscle

Hisaya TSUJIMOTO, Tomoe HIRANO, Hideki SUZUKI, Norikatu KASUGA

#### Abstract

The effect of voluntary running training on the myosin heavy chain (MyHC) isoform composition was investigated in the 17 and 19-week-old female Fischer344 rats (N=13).

Animals were divided into two groups: sedentary (S; N=7) or voluntary running training (VT; N=6) group. Animals in group VT were given free access to a running wheel for 12 weeks. The single fibers were dissected from superficial portion of lateral gastrocnemius muscles (GAS). The single fiber type was determined by MyHC composition.

The average running revolution of group VT was  $6418 \pm 1117$  (Mean  $\pm$  SD) per day (Min.;  $4837 \pm 1852$ , Max. ;  $8340 \pm 2806$ ). The body weight of group VT was significantly heavier than that of group S. The GAS weight of group VT was significantly higher than that of group S. There was no significant difference in the relative GAS weight in each group. In the relative composition of type IIB single fiber, the pure IIB fiber was decreased and hybrid fiber (included IIB+d MyHC) was increased. Hybrid fiber which included in type I MyHC was observed in type IIB hybrid fiber. In the relative composition of type IID single fiber, the pure IID fiber tended to decrease and hybrid fiber (included IId+b MyHC) tended to increase. However, there was no statistically difference between two groups.

These results indicate that voluntary running training causes the increase of IId MyHC and increase in the relative composition of hybrid fiber, consequently.

**Key words:** Voluntary running training, single fiber, Myosin heavy chain isoform, Fischer 344 female rat, Gastrocnemius muscle

#### 緒 言

成熟期ラット骨格筋の筋線維タイプは、構成蛋白質であるミオシンの重鎖成分(Myosin heavy chain ; MyHC)を基本として分類されている<sup>1)-3)</sup>。ラット骨

格筋の MyHC には 7 種類のアイソフォームが存在し、そのうち 4 種類 ( , a, b, d) が通常の成熟期の骨格筋で発現している<sup>4)5)</sup>。トレーニングによる骨格筋使用の増加、あるいは骨格筋の不使用により全筋の MyHC アイソフォーム構成比は変化

1. 久留米大学 健康スポーツ科学センター
2. 岐阜聖徳学園大学 短期大学部
3. 愛知教育大学

する<sup>9-12</sup>。この変化の一因は単一筋線維内の MyHC アイソフォームの混在化である<sup>13-17</sup>。これまで、我々は自発走トレーニングにより腓腹筋外側部表層の筋線維が動員され、筋線維横断面積とその分布が変化することを報告してきた<sup>18</sup>。また自発走トレーニングによりラット足底筋の MyHC アイソフォーム構成比が変化し、その変化量が通常の持久的トレーニングよりも大きいことも報告した<sup>19</sup>。これらのことから自発走トレーニングにより動員されている腓腹筋外側部表層の単一筋線維において MyHC アイソフォーム構成比に変化がみられるのではないかと予想される。

本研究はラット腓腹筋外側部表層を用いて、自発走トレーニングによる MyHC アイソフォームの変化の有無を、単一筋線維レベルで明らかにすることを目的とした。

## 方 法

実験には17~19週齢のFischer344系雌ラットを用いた。対照群 (sedentary ; S群) と12週間の自発走トレーニングを行った群 (voluntary exercise training; VT群) を設けた。実験動物は昼夜逆転した12時間の明暗サイクルで、室温 $22 \pm 1$  , 湿度 $60 \pm 5\%$  の環境下で飼育した。餌は固形飼料 (日本クレア ; CE-2) を用い、飲水は自由摂取とした。なお、実験動物の取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に沿って行った<sup>20</sup>。各週齢時にラットをペントバルビタール溶液にて麻酔し断頭屠殺した。その後直ちに腓腹筋を抽出し秤量した。実体顕微鏡下で弛緩溶液中にて、腓腹筋外側部表層より単一筋線維を無作為に抽出し抽出した<sup>21,22</sup>。ラット腓腹筋外側部表層は組織化学的にタイプ B と D の速筋線維のみから構成され、典型的な速筋線維の適応を検討するのに適した部位ではないか考えられる<sup>23,24</sup>。単一筋線維は、変性剤を添加し、室温(20 )で20分間以上静置し変性させ電気泳動用サンプルとした<sup>21,22</sup>。MyHC アイソフォームの分離は、SDS 存在下の電気泳動法 (SDS-PAGE) にて分離を行った<sup>21,22,25</sup>。泳動はマイクロスラブ電気泳動装置 (KS 8020型: マリソル) を用いて行った。泳動は変性サンプル5  $\mu$ l を泳動溝にのせ開始した。濃縮ゲル中は50V、マーカー色素が完全に分離ゲルに入ってから150Vで行った。泳動時間はマーカー色素が分離ゲルに入ってから15時間とした。泳動後ゲルは銀染色 (銀染色キットワーク: 和光純薬) を施した

ンパク質を可視化した<sup>26</sup>。MyHC アイソフォームの同定は、全ての MyHC アイソフォームを含むように腓腹筋と横隔膜筋、ヒラメ筋より抽出し調整された粗ミオシン混合溶液を、被験溶液と同時に流して得られたパターンをマーカーとして行った<sup>21,22,25</sup>。

各群では平均値と標準偏差及び標準誤差を算出し統計学的な検定を行った。各測定項目はまず一要因の分散分析にて検定し、有意差がみられた場合の多重比較には、統計量を t 値とする Ryan 法を用いた。MyHC 構成比の分析は<sup>2</sup> 検定にて行った。全ての検定において有意水準は 5% ( $p < 0.05$ ) とした<sup>27</sup>。

## 結 果

トレーニング期間中のVT群の1日当りの回転数について実験動物個々の値を図1に示した。VT群の1日当りの平均回転数は1週目で最小値の $2204 \pm 1040$ 回を示したが6週目まで徐々に増加し、6週目には最大値 $8962 \pm 1809$ 回を示しその後徐々に減少した。1日当りの回転数の総平均は、 $6418 \pm 1117$ 回 (平均値  $\pm$  標準偏差,  $4837 \pm 1852 \sim 8340 \pm 2806$ )であった。

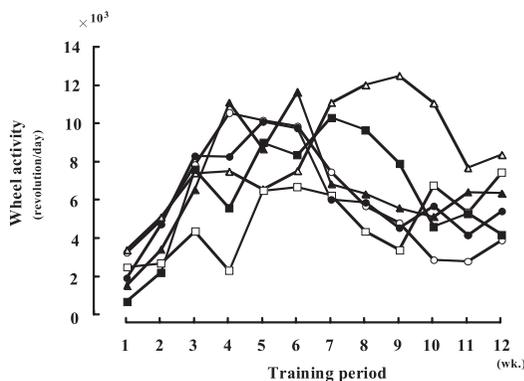


Fig. 1 Changes of voluntary running activity

○— Voluntary 1, △— Voluntary 2, □— Voluntary 3  
●— Voluntary 4, ▲— Voluntary 5, ■— Voluntary 6

Table 1 Body weight, muscle weight and relative muscle weight in each group

Groups (Number)	Sedentary (7)	Voluntary (6)
Body weight (g)	174 $\pm$ 2	199 $\pm$ 4 *
GAS weight (mg)	871 $\pm$ 16	974 $\pm$ 18 *
Relative GAS weight (mg/g)	5.0 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.3

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM

\* : Significant difference from the value at sedentary ( $p < 0.05$ )

GAS : gastrocnemius muscle

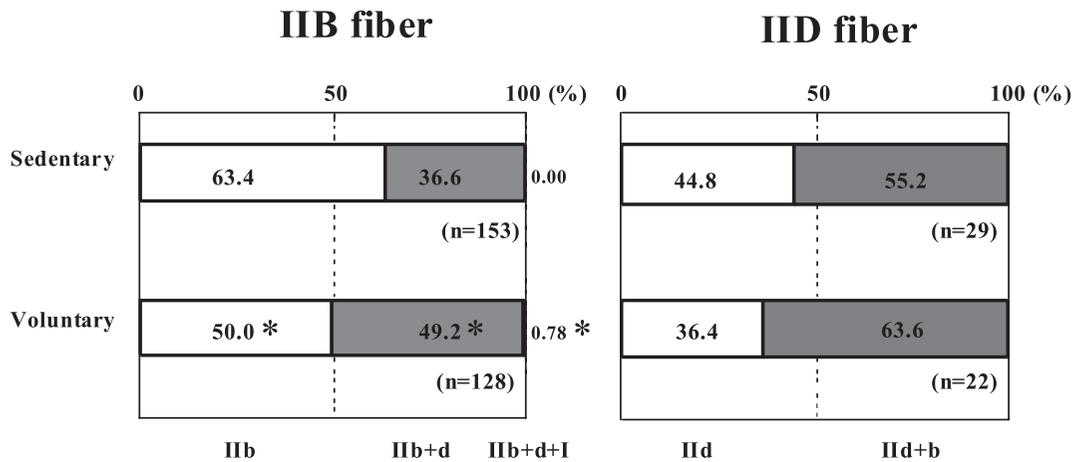


Fig.2 Relative proportion of each group in each fiber classified according to myosin heavy chain isoform expression  
\* : Significant difference from the value at sedentary(p<0.05)

最終体重及び腓腹筋重量と相対的腓腹筋重量を平均値と標準誤差により表 1 に示した。最終体重ではVT群がS群に比べて有意に高値を示した。腓腹筋重量ではVT群がS群に比べて有意に高値を示し11.8%高い値を示した。相対的腓腹筋重量では、両群間に有意な差は認められなかった。

図 2 には MyHC アイソフォームにより分類した単一筋線維の相対構成比を示した。腓腹筋外側部より抽出した単一筋線維は MyHC アイソフォームを基本としてタイプIIB線維とタイプIID線維に分類した。次にタイプIIB線維では単一筋線維に含まれる MyHC アイソフォームにて3タイプ(IIb,IIb+d,IIb+d+I), タイプIID線維では2タイプ(IId,IIb+b)に分類しそれぞれの相対値を算出した。タイプIIB線維では、IIb MyHC のみを含むピュアIIb線維の割合が減少し(S群; 63.4%, VT群; 50.0%), IIb MyHC にIIdを含むハイブリッド線維の割合が増加した(S群; 36.6%, VT群; 49.2%)。さらにタイプIIB線維ではIIb MyHC にIIdとIを含むハイブリッド線維が0.78%出現した。タイプIID線維では、IId MyHC のみを含むピュアIId線維の割合はS群で44.8%, VT群で36.4%であり、有意な差はみられなかった。またIId MyHC にIIbを含むハイブリッド線維の割合はS群で55.2%, VT群で63.6%であり、有意な差はみられなかった。

考 察

本研究では、腓腹筋外側部から抽出した単一筋線維で MyHC によりタイプIIBと分類される線維において、自発走トレーニングによりハイブリッド線維 (IIb MyHC にIIdを含む線維) の増加が観察された。また、MyHC によりタイプIIDと分類される単一筋線維においても有意ではないもののハイブリッド線維 (IId MyHC にIIbを含む線維) の増加傾向が見られた。これらは、ピュアなタイプIIB線維とハイブリッドのタイプIIB線維中において、IId MyHC 合成の開始あるいは亢進が引き起された事を示している。Kirschbaumらは、活動量の増大により MyHC アイソフォーム蛋白合成過程において、異なったタイプのアイソフォーム合成開始のスイッチングが引き起こされると報告している<sup>28)</sup>。Petteらは活動量の変化に伴う MyHC アイソフォーム合成の変化は“nearest-neighbor”ルール(タイプI⇔タイプIIa⇔タイプIIb⇔タイプIId)に従うとしている<sup>29)</sup>。本研究の結果もこれらと同様の機序により引き起されたものと考えられる。つまりハイブリッド線維の増加は、タイプIIbを合成していた筋核において、自発走刺激によりIId MyHC アイソフォーム合成開始へのスイッチングが起り、IId MyHC 合成が開始し蓄積されたことによると考えられる。Bottinelliらによると骨格筋のテンションコストはタイプIIBで最も高

く、タイプIIAとIIDは中間を、タイプIは最も低値を示すとしている<sup>30)</sup>。これは、活動量増大に伴うMyHCアイソフォーム移行の順序と同じである。これらのことからPetteは、エネルギーの要求量と供給量の不均衡がMyHCアイソフォーム合成スイッチングの重要なトリガーになっているのではないかと示唆している<sup>8)</sup>。本研究で用いた自発走トレーニングは、短時間の高速(高強度)での運動を高頻度にて何度も繰り返すことで組み立てられている<sup>31)</sup>。このトレーニング中にタイプIIB線維が多く動員されたため、必要なエネルギー量が増大しエネルギーの供給量との不均衡が生じて、MyHCアイソフォーム合成のスイッチングが起ったのではないかと思われる。また、MyHCアイソフォーム移行の機序としては、Ca<sup>2+</sup>の恒常性の変化が重要な役割を果たしているとする考えもある<sup>15)32)</sup>。さらに、先に示したエネルギーの需要と供給の不均衡と細胞内Ca<sup>2+</sup>の動態変化はリンクしているのではないかとする示唆もある<sup>15)32)</sup>。MyHCアイソフォーム変化の機序としては、運動による刺激の変化を遺伝子発現の変化にまで伝達するいくつかの経路が存在し、トレーニングの結果としてみられるMyHCアイソフォームタイプは、それらが相互作用した結果であると考えられる。本研究からこれらのことを推定することは困難であり、さらに詳細な検討が必要である。

本研究ではMyHC IIBとIIDにさらにタイプI MyHCを含む線維も観察された。Petteらは“nearest-neighbor”ルールに従いピュアなタイプのギャップを埋めるように種々のハイブリッドファイバー(タイプI⇔タイプI/IIA⇔タイプIIA/I⇔タイプIIA⇔タイプIIA/D⇔タイプIID/A⇔タイプIID⇔タイプIID/B⇔タイプIIB/D⇔タイプIIB)の分類を示している<sup>29)</sup>。本研究で示された2つの速筋タイプに1つの遅筋タイプMyHCが含まれた単一筋線維は、Petteらの分類より逸脱している。このような筋線維は“nearest-neighbor”ルールに従わない機序でMyHCアイソフォーム合成が変化しているのではないかと考えられる。この要因として自発走により引き起こされる筋損傷の影響が考えられる。IrintchevとWernig<sup>33)</sup>、小笠原ら<sup>34)</sup>およびWernigら<sup>35)</sup>は、自発走による筋の損傷とファイバータイプグルーピングを報告している。筋損傷では、細胞膜損傷による筋細胞自体の損傷と神経と筋の乖離、神経・筋接合部の損傷が考えられる。自発走により筋細胞自体が損傷を受けた場合、損傷の修復の過程で融合したサテライト細胞が異なる

MyHCを発現することによるタイプ移行の可能性は考えられる。さらに自発走による支配神経と筋の乖離、神経・筋接合部の損傷は筋に対する神経支配の変化を引き起すのではないかと示唆されている<sup>31)</sup>。これもMyHCアイソフォーム合成のスイッチングを引き起す一因ではないかと考えられる。神経・筋の乖離により支配神経は一時的に多重神経支配となり、その後単一神経支配へと進むと考えられており<sup>31)</sup>、その場合“nearest-neighbor”ルールを逸脱してMyHCアイソフォームが合成される可能性がある。本研究では筋損傷に対する指標の測定は行っていないが、これらのメカニズムがMyHC構成比において“nearest-neighbor”ルールを逸脱する変化を引き起こしたのではないかと考えられる。

本研究では、自発走トレーニングによりIID MyHC合成の開始あるいは増加によるハイブリッド線維の増加がみられた。ハイブリッド線維の存在意義と筋線維タイプ移行のメカニズムについては未だ不明な点が多く、今後詳細な研究が必要である。

#### 引用文献

- 1) Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol*. 1993 Nov;5(6):695-705.
- 2) Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*. 2000 Sep 15;50(6):500-9.
- 3) Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1994 Aug;77(2):493-501.
- 4) Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 1996 Apr;76(2):371-423.
- 5) Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990;116:1-76.
- 6) Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002 Nov;81(11 Suppl):S40-51.
- 7) Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exerc Sport Sci Rev*. 1991;19:269-312.
- 8) Pette D. Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol Scand*. 1998 Mar;162(3):367-76.

- 9) Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol.* 1997;170:143-223.
- 10) Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity; potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve.* 2000 May;23(5):661-79.
- 11) Talmadge RJ, Roy RR, Bodine-Fowler SC, Pierotti DJ, Edgerton VR. Adaptations in myosin heavy chain profile in chronically unloaded muscles. *Basic Appl Myol.* 1995;5(2):117-37.
- 12) Goldspink G. Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans.* 2002 Apr;30(2):285-90.
- 13) Bottinelli R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflugers Arch.* 2001 Oct;443(1):6-17.
- 14) Parry DJ. Myosin heavy chain expression and plasticity: role of myoblast diversity. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001 Oct;29(4):175-9.
- 15) Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001 May;115(5):359-72.
- 16) Staron RS, Johnson P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 1993 Nov;106(3):463-75.
- 17) Stephenson GM. Hybrid skeletal muscle fibres: a rare or common phenomenon? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001 Aug;28(8):692-702.
- 18) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層の筋線維形態に及ぼす自発走トレーニングの影響. 久留米大学比較文化研究. 2003 33:169-81.
- 19) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 梅村義久. 自発走によるラット足底筋ミオシン重鎖アイソフォーム構成比の変化. 久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要. 2002 Dec;10: 37-44.
- 20) 総理府内閣総理大臣官房管理室実験動物飼育保管研究. 実験動物の飼養及び保管等に関する基準の解説. 1版. 東京: ぎょうせい, 1980.
- 21) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. 雌性Fischer344系ラットヒラメ筋におけるミオシン重鎖アイソフォーム構成比の加齢変化. 久留米大学保健体育センター研究紀要. 1998 Jul; 6 : 21-8.
- 22) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 藤田慎一, 小笠原仁美, 稲垣洋, 山下晋, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層のタイプ・単一筋線維におけるミオシン重鎖構成と筋線維横断面積の関係について. 久留米大学保健体育センター研究紀要. 1999 Jul;7: 27-32.
- 23) Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol.* 1996 Jan;80(1):261-70.
- 24) Rosser BW, Norris BJ, Nemeth PM. Metabolic capacity of individual muscle fibers from different anatomic locations. *J Histochem Cytochem.* 1992 Jun;40(6):819-25..
- 25) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛. 走及びジャンプトレーニングによるラット骨格筋ミオシン重鎖アイソフォーム組成の変化. 体力科学. 1995; 44: 97-104.
- 26) Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels; a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 1981;117: 307-10.
- 27) 森敏昭, 吉田寿夫. 心理学のためのデータ解析テクニカルブック. 1版, 京都: 北大路書房, 1990.
- 28) Kirschbaum BJ, Kucher H, Termin A, Kelly AM, Pette D. Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin expression in rat fast-twitch muscle. *J Biol Chem.* 1990; 265: 13974-980.
- 29) Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol Scand.* 1999 Aug;166(4):261-77.
- 30) Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J Physiol.* 1994 Dec 15;481 ( Pt 3):663-75.
- 31) 春日規克, 山下晋, 小笠原仁美, 鈴木英樹, 辻本尚弥, 石原昭彦. 加負荷式回転車輪によるラットの自発走特性と骨格筋への効果. 体力科学. 1999; 48: 99-110.
- 32) Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol.* 2002 Aug;27(4):423-48.
- 33) Irintchev A, Wernig A. Muscle damage and repair in

voluntarily running mice: strain and muscledifferences.  
Cell Tissue Res. 1987 Sep;249(3):509-21.

- 34) 小笠原 仁美, 山下 晋, 平野 朋枝, 春日 規克.  
回転車輪の自発走により誘発される筋損傷とト  
レーニング効果. 日本運動生理学雑誌.

2000;7(2):57-63.

- 35) Wernig A, Irintchev A, Weisshaupt P. Muscle in-  
jury, cross-sectional area and fibre type distribu-  
tion in mouse soleusafter intermittent wheel-  
running. J Physiol. 1990 Sep;428:639-52.