

= 原著論文 =

## ラット足底筋の蛋白濃度および量の加齢変化

辻本 尚 弥<sup>1)</sup> 鈴木 英 樹<sup>2)</sup>

### Age-related Changes of Protein Concentration and Protein Content in Rat Plantaris Muscle

Hisaya TSUJIMOTO<sup>1)</sup> and Hideki SUZUKI<sup>2)</sup>

#### Abstract

We studied changes of protein concentration and protein content with aging in female Fischer344 rat plantaris muscle. 6-, 12-, 20- and 27-month old female rats were examined.

The results showed that body weight increased up to the age of 20 months and then decreased to 27-month-old. Plantaris (PLA) muscle weight of 27-month-old was significantly lower than 12- and 20-month old. The relative PLA weight decreased to 20-month-old. There was no significant difference in relative PLA weight between 20- and 27-month old. There was no significant difference in concentration of total protein (TP) and non-collagenous protein (NCP) at all ages. The protein content of TP on the PLA muscle in 27-month-old rats was lower than 12- and 20-month old. The protein content of NCP on the PLA muscle in 27-month-old rats was lower than other aged group. There was no significant difference in percentage of NCP per TP at all ages.

These results indicate that protein concentrations and the ratio of NCP per TP in the PLA muscle are not changed with aging in rats. We conclude therefore that while aging affect the overall PLA muscle weight, each constituent protein is affected equally.

**Key words :** 雌性フィシャー344ラット、蛋白質濃度、蛋白質含量、非コラーゲン性蛋白質、加齢  
female Fischer 344 rat, protein concentration, protein content, non-collagenous protein, aging

#### 結 言

ヒトや実験動物において骨格筋の機能は、成熟期以降加齢に従い低下する<sup>1)-5)</sup>。特に老齢期の筋力低下に関しては多くの報告がみられる<sup>1)-5)</sup>。筋力の低下は、加齢に伴う筋線維の萎縮や減少が主因となるが<sup>4)</sup>、このような筋の量的変化は構成成分個々の変化の結果である。骨格筋は水分(筋重量の約79%)や蛋白質(約16%)、脂質(約3.1%)、グリコゲ

ン(約0.2~1.5%)などが構成されている<sup>6)</sup>。筋の機能はそれを構成する種々の筋蛋白質が担っており、老化による筋の蛋白量や蛋白濃度の変化は、筋機能の低下をもたらす<sup>1)4)</sup>。骨格筋の機能低下は、運動や移動能力の低下をもたらす、さらに活動量の減少を引き起こす。これらは負のスパイラルな関係にあり、老人の身体機能の低下を促進する可能性がある。これまで我々は実験動物を用いて、加齢や老化、不活動またトレーニングによる各筋蛋白質の変

1) 久留米大学健康・スポーツ科学センター

2) 愛知教育大学保健体育講座

化についての基礎的な資料を提供してきた<sup>7)・12)</sup>。我々は先の研究において、ラット成熟期の6ヶ月齢から老齢期27ヶ月齢までの前脛骨筋を比較した結果、筋重量は増加するが総蛋白 (Total protein : TP)・非コラーゲン性蛋白 (Non-collagenous protein : NCP)・筋原線維蛋白の濃度には変化がみられないことを報告した<sup>7)11)</sup>。本研究では、解剖学的には下肢の後部に位置し、前脛骨筋に対して拮抗的な関係にあり、底屈時に働く筋である足底筋に注目した。足底筋は、老化にともない選択的に萎縮や筋線維数の減少がみられる Type 線維を多く含んでいると報告されている<sup>13)</sup>。

本研究の目的は、足底筋を対象に筋量の増加がみられる成熟期と萎縮がみられる老齢期において種々の筋蛋白量及び蛋白濃度とその比率を比較し、加齢による変化を明らかにすることである。

## 方 法

実験動物には雌性 Fischer344系ラット27匹を用いた (日本 SLC)。飼育ケージは24×38×20cmの大きさで、餌 (CE-2 : 日本クレア) 及び飲水は自由摂取とし、昼夜逆転した12時間の明暗サイクルで室温22±1、湿度60±5%の環境下で飼育した。実験群として6、12、20および27ヶ月齢の4群 (各群6-7匹) を設けた。実験月齢に達した時点で、ラットの体重を計測してペントバルビタール麻酔下にて頸動脈より放血し屠殺した。その後、足底筋を摘出し筋湿重量を測定した後、ただちに液体窒素により冷却したイソペンタン中で瞬間凍結し、生化学的分析を行うまで-60の冷凍庫で保存した。なお飼育・屠殺でのラットの取り扱いについては、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に沿って行った<sup>14)15)</sup>。また本実験では飼育の過程にお

いて病的に死亡したラットは除外した。実験に供したラットの観察からは活動、特に歩行などの行動に異常は認められなかった。また本実験では老齢期を含めて無作為に数匹のラットを選抜し、筋張力などの生理的機能を測定したが異常な結果は認められなかった。

各筋蛋白質の分析には、保存していた足底筋の筋腹部分を用いた。まず筋を Tsika ら<sup>16)</sup>の方法に従いホモジナイズして、TP濃度及びNCP濃度測定のためサンプルを分取した。NCPの抽出と精製は Sugita らの方法によった<sup>17)</sup>。各蛋白質の定量には Biuret 法を用いた<sup>18)</sup>。各蛋白質濃度の測定後、筋重量にTP濃度を乗じて総蛋白含量を算出した。また、TP中に占めるNCPの割合 (NCP/TP比) も算出した。

各測定値は群ごとに平均値及び標準偏差を求め統計学的な検定を行った。体重、筋重量、各蛋白質含量、各蛋白質濃度および各蛋白質比では、それぞれの群の比較に、分散の検定にはF検定法を用い、分散が等質であった場合はt検定法を、分散が等質でなかった場合はAspin-Welch検定法を用いた。また両検定においては、Ryanの名義的な有意水準を用いた<sup>19)</sup>。有意水準は5% (p<0.05) とした<sup>20)</sup>。

## 結 果

各月齢における体重と足底筋重量および相対的足底筋重量を平均値と標準偏差により表1に示した。

体重は、6ヶ月齢に比べ12、20、27の各月齢で、12ヶ月齢に比べ20、27の各月齢で有意に高値を示し、6ヶ月齢から20ヶ月齢まで増加した。しかし、20ヶ月齢と27ヶ月齢では有意な差が認められなかった。足底筋重量は、12および20ヶ月齢に比べ27ヶ月齢が有意に低値を示した。他の月齢間の比較では有意な

Table.1 Body weight, plantaris muscle weight and relative plantaris muscle weight of rat in each age.

	6 month (n=7)	12 month (n=7)	20 month (n=7)	27 month (n=6)
Body weight (g)	191 ± 7	226 ± 18*	275 ± 23* †	255 ± 51* †
Plantaris weight (mg)	181 ± 12	195 ± 16	196 ± 9	164 ± 24 † ‡
Relative plantaris weight (mg/100g BW)	95 ± 5	86 ± 5*	72 ± 5* †	65 ± 6* †

Values are expressed as mean ± SD BW ; Body weight

\* : Significant difference from the value in 6 month group (p<0.05)

† : Significant difference from the value in 12 month group (p<0.05)

‡ : Significant difference from the value in 20 month group (p<0.05)

差が認められなかった。体重100g 当りで示した相対的足底筋重量は、6ヶ月齢に比べ12、20、27の各月齢で有意に低値を示した。さらに12ヶ月齢との比較では、20、27の各月齢で有意に低値を示した。筋重量において有意な差がみられた20および27月齢間においては、有意な差は認められなかった。

表2には、各月齢における足底筋の各蛋白質濃度、各蛋白質含量及び各蛋白質の濃度比を平均値と標準偏差により示した。足底筋のTP濃度は、6ヶ月齢から20ヶ月齢及び筋の萎縮がみられる20から27ヶ月齢においても有意な差はみられなかった。足底筋のTP含量については、筋重量と同様な変化がみられ、筋の萎縮がみられる27ヶ月齢で、12および20ヶ月齢に比べ有意に低値を示した。コラーゲンなどの細胞外の蛋白質を除外したNCP濃度は、TP濃度と同様に、各月齢間において有意な差は認められなかった。NCP含量についても、TP含量と同様に27ヶ月齢で、12および20ヶ月齢に比べ有意に低値を示し、さらに6ヶ月齢との間にも有意な差が認められた。NCP/TP比は、6ヶ月齢から20ヶ月齢においても、20ヶ月齢から27ヶ月齢においても有意な差はみられなかった。

## 考 察

本研究では、解剖学的な位置と生理学的機能が前脛骨筋と拮抗的な関係にある足底筋において、筋蛋白質の各濃度および濃度比では加齢に伴う変化がみられなかった。一方、筋重量の変化に伴う筋蛋白含量は変化し、筋の老性萎縮が顕著にみられる27ヶ月齢において有意に低値を示した。

ラットなどの実験動物では体重当りの相対的筋重量が、萎縮や肥大の指標となることが知られてい

る<sup>21)</sup>。各月齢における体重、筋重量と相対的筋重量の変化は、20ヶ月齢では体重の増加に見合う筋重量の増加がみられなかったことを示している。これは体重増加による骨格筋への刺激に対する適応能が低下した事を示していると考えられる。一方、20ヶ月齢から27ヶ月齢の老齢期においては体重及び筋重量はともに低下していた。これは27ヶ月齢という老齢期において筋の萎縮がみられたことを示している。老齢ラット足底筋で、組織化学的分類による筋線維タイプ別にみるとType 線維に比べType 線維の横断面積<sup>22)</sup>と筋線維数<sup>23)</sup>の減少が大きいと報告されている。今回対象とした足底筋はType 線維の構成比が大きい筋である<sup>13)</sup>ため、20ヶ月齢から27ヶ月齢にかけてみられた筋重量の減少は、Type 線維の萎縮および本数の減少が大きな要因であると考えられる。先報の前脛骨筋との比較では、相対的筋重量で20ヶ月齢から27ヶ月齢にかけての変化が異なっていた。すなわち相対的な筋重量が、前脛骨筋では6ヶ月齢から27ヶ月齢まで減少しているが、足底筋では体重低下がみられた20ヶ月齢から27ヶ月齢では有意な差が認められなかった。このことは、解剖学的な位置と姿勢維持時および運動時の役割の違いに起因する、足底筋と前脛骨筋の活動量の違いを反映したものであるのではないかと考えられる。しかし、今回は個々の筋の活動量等を測定していないため詳細は不明である。

次に蛋白質の量および濃度、濃度比について、本研究では筋を構成している蛋白質を大きくTPとNCPに分類した。TPは筋を構成する蛋白質全てであり、NCPはTPより細胞外の蛋白質を除いた細胞内の蛋白質を示している。蛋白濃度の老齢期の変化について、筋蛋白濃度は加齢に伴う蛋白合成能の

Table.2 Protein concentration, protein content, and NCP per TP ratio of plantaris muscle in each age.

	6 month (n=7)	12 month (n=7)	20 month (n=7)	27 month (n=6)
TP concentration (mg/g muscle weight)	273 ± 13	260 ± 26	263 ± 17	252 ± 26
TP content (mg/muscle weight)	48 ± 4	51 ± 5	52 ± 4	41 ± 8 † ‡
NCP concentration (mg/g muscle weight)	153 ± 14	154 ± 19	153 ± 13	137 ± 19
NCP content (mg/muscle weight)	27 ± 3	29 ± 5	30 ± 3	22 ± 3* † ‡
NCP / TP ratio (%)	56 ± 3	58 ± 8	58 ± 2	55 ± 8

TP; total protein, NCP; non-collagenous protein  
Legends as same as table 1.

低下を反映して老齢期で低値を示すと報告されている<sup>24)</sup>。また各蛋白質の比については、老齢群のラットでは若齢群に比べて収縮蛋白質の割合が少ないとする報告がある<sup>25)</sup>。しかし、Youngら<sup>26)</sup>は老齢期と若齢期のラット速筋では蛋白質濃度には差がみられないと報告している。また急激に萎縮を引き起こす後肢懸垂モデルでは、ラットの速筋でも萎縮はみられるが、種々の蛋白質濃度や各蛋白質の比に変化がみられないとする報告がある<sup>27)28)</sup>。後肢懸垂などで引き起こされる廃用性の萎縮では、筋全体の蛋白質量は減少するが、筋蛋白質濃度や濃度の比は維持されていることが考えられる。加齢に伴い蛋白質合成能が低下しRNA濃度が低下した場合においても、筋蛋白質濃度に顕著な差が生じるとは限らず、また老齢による活動量の低下が筋重量減少の原因と考えた場合には、蛋白質濃度やそれらの比に変化がみられない後肢懸垂モデルの結果からも、本研究の蛋白質濃度や濃度比の変化は矛盾しないと思われる。また、本研究に用いたラットの観察では、老齢期である20ヶ月齢および27ヶ月齢においても、姿勢維持や歩行などの動作において異常はみられなかった。ラットなど実験動物では老化により活動量が低下すると報告されている<sup>29)</sup>。しかし、活動は停止せず、骨格筋の生理的な機能が維持するための運動刺激はある。これにより成熟期と同様に、萎縮のみられる老齢期においても各蛋白質の合成能は維持されているのではないかと考えられる。筋において蛋白質濃度や濃度比が変化しないということは、生理学的にみて重要な意味がある。筋は収縮のために分化し、特化した細胞であり、細胞内に各種筋蛋白質よりなる規則的な立体構造をもち、それが収縮という生理的機能を保障している。筋蛋白質濃度や各蛋白質の濃度比が変化することは、細胞内の環境変化を引き起こすだけでなく、筋細胞内の規則的な立体構造とそれによる筋組織としての高次構造の乱れを生じ、筋の生理的機能を低下させる可能性があると考えられる。そのため正常な生理的機能保持のためには、筋の形態的・量的変化の過程においても、筋蛋白質濃度や各蛋白質の濃度比が厳密に維持されているのではないかとと思われる。

以上のことから、本研究ではラット足底筋においても前脛骨筋と同様に、成熟期や筋の萎縮がみられる老齢期で、蛋白質含量に変化はみられるものの、筋蛋白質濃度及び各蛋白質の濃度比は変化せず、各蛋白質は動的に平衡が保たれていることが示された。

## 参 考 文 献

- 1) Bautmans I, Van Puyvelde K, Mets T. Sarcopenia and functional decline: pathophysiology, prevention and therapy. *Acta Clin Belg*. 2009 Jul-Aug; 64(4): 303-16.
- 2) Boirie Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*. 2009 Oct; 13(8): 717-23.
- 3) Aniansson A, Hedberg M, Henning GB, Grimby G. Muscle morphology, enzymatic activity, and muscle strength in elderly men: a follow-up study. *Muscle Nerve*. 1986 Sep; 9(7): 585-91.
- 4) Rogers MA, Evans WJ. Changes in skeletal muscle with aging: effects of exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 1993;21:65-102.
- 5) Taylor AW, Noble EG, Cunningham DA, Paterson DH, Rechnitzer P. Ageing, skeletal muscle contraction properties and enzyme activities with exercise. (In) Sato Y, Poortmans J, Hashimoto I, Oshida Y. *Integration of Medical and Sports Science Med. Sport Sci* 37. Tokyo; Karger: 1992. p.109-25.
- 6) 山口正弘, 加納和孝, 平田恒彦, 高坂健二. 運動生化学. 1版. 京都: 金芳堂; 1990. p.53-68.
- 7) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛, 中年期での運動様式の異なるトレーニングに対する骨格筋の変化. 大和証券ヘルス財団の助成による研究業績集, 1994; 18: 131-5.
- 8) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. 走及びジャンプトレーニングの前脛骨筋に対する効果. 名古屋経済大学・市屯学園短期大学 自然科学研究会誌 1994; 29(1): 5-18.
- 9) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克. 老齢期ラット下肢骨格筋における走及びジャンプトレーニングの効果. 名古屋経済大学・市屯学園短期大学自然科学研究会誌 1995; 30(1): 9-21.
- 10) 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.
- 11) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛, 加齢およびトレーニングに対するラット前脛骨筋蛋白質濃度の変化. 久留米大学比較文化研究, 2002; 18: 77-90.

- 12) 辻本尚弥, 平野朋枝, 鈴木英樹, 春日規克. ラット腓腹筋外側部表層のミオシン重鎖アイソフォーム構成に及ぼす持久性走トレーニングの影響 - 単一筋線維での検討 -. 久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要 2004 ; 12(1) : 23-9.
- 13) Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat.* 1984 Nov; 171(3): 259-72.
- 14) 日本実験動物協会. 実験動物の技術と応用 入門編. 1版 東京. アドスリー : 2004.
- 15) 笠井一弘, 大和田一雄. アニマルマネジメント - 動物管理・実験技術と最新ガイドラインの運用. 1版 東京. アドスリー : 2007.
- 16) Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM. Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *J.Appl.Physiol.* 1987; 62(6): 2180-6.
- 17) Sugita H, Okumura Y, Ayai K. Application of property of troponin to determination of tropomyosin content of a small pieces of muscle. *J.Biochem.* 1969; 65(6): 971-2.
- 18) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret method. *J.Biol.Chem.* 1949; 177: 751-6.
- 19) Ryan TA. Significance tests for multiple comparison of proportions, variances, and other statistics. *Psychol. Bull.* 1960; 57: 318-28.
- 20) 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.
- 21) 内山秀一, 玉木哲朗, 中野昭一. ラット骨格筋の絶対重量と体重を基準とした相対成長に関する研究. *日本生理誌.* 1994 ; 6 : 7-16.
- 22) Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC. Skeletal muscle atrophy in old rats: Differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev.* 1991 Oct; 60(2): 199-213.
- 23) Alnaqeeb MA, Goldspink G. Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. *J Anat.* 1987 Aug; 153: 31-45.
- 24) Srivastava U, Chaudhary KD. Effect of age on protein and ribonucleic acid metabolism in mouse skeletal muscle. *Can J Biochem.* 1969 Mar; 47(3): 231-5.
- 25) Gutmann E, Hanzlikova V, Jakoubek B. Changes in the neuromuscular system during old age. *Exp Gerontol.* 1968 Aug; 3(2): 141-6.
- 26) Young JC, Chen M, Holloszy JO. Maintenance of the adaptation of skeletal muscle mitochondria to exercise in old rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1983; 15(3): 243-6
- 27) Linderman JK, Gosselink KL, Booth FW, Mukku VR, Grindeland RE. Resistance exercise and growth hormone as countermeasures for skeletal muscle atrophy in hindlimb-suspended rats. *Am J Physiol.* 1994 Aug; 267(2 Pt 2): R365-71.
- 28) Tsika RW, Herrick RE, Baldwin KM. Effect of anabolic steroids on skeletal muscle mass during hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 1987 Nov; 63(5): 2122-7.
- 29) Gulve EA, Rodnick KJ, Henriksen EJ, Holloszy JO. Effects of wheel running on glucose transporter (GLUT4) concentration in skeletal muscle of young adult and old rats. *Mech Ageing Dev.* 1993 Feb; 67(1-2): 187-200.