

=原 著=

ラット腓腹筋外側部表層のタイプII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

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**

Myosin Heavy Chain Composition and Fiber Size in Type II-single Fibers
on the Lateral Superficial Portion of the Gastrocnemius Muscle in Rats

Hisaya TSUJIMOTO*, Hideki SUZUKI**, Shin-ichi FUJITA**,
Hitomi OGASAWARA**, Hiroshi INAGAKI**, Susumu YAMASHITA**
and Norikatsu KASUGA**

Abstract

When the skeletal muscle was atrophied or hypertrophied, myosin heavy chain (MyHC) composition is also changed. The purpose of this study is to make clear the presence of the relation between fiber cross sectional area and MyHC composition. The single fibers were dissected from superficial portion of lateral gastrocnemius muscles in fifteen-week old female Fischer-344 rats. The fiber type was determined by MyHC composition. The mean cross sectional area of II b fibers was larger than that of hybrid (II b+d) fibers. However, the single fibers cross sectional area of II b and hybrid fibers was distributed far and wide. These results indicated that there is no relation between fiber cross sectional area and MyHC composition.

Key words : Myosin heavy chain composition, fiber size, single fiber, gastrocnemius muscle, rat

緒 言

成熟期のラット骨格筋では、筋線維はミオシン重鎖 (Myosin heavy chain; MyHC) 上に存在する ATPase 活性部位の、酸あるいはアルカリに対する安定性を基準として通常4タイプに分類されている^{8),20)}。組織化学的にタイプI, II a, II b, II dと判定される筋線維は、それぞれ主にI, II a, II b,

II dのMyHCより構成されている³⁰⁾。一方、ヒラメ筋のタイプII a線維や腓腹筋外側部のタイプII b線維では単一筋線維内にMyHCが混在すると報告されている^{2),7),29),32)}。また筋線維の形態(横断面積)に変化がみられる尾部懸垂^{6),22),27)}や脊髄切断^{12),13),28)}および宇宙飛行²⁾などの場合に、MyHCの混在はさらに進み、MyHC混在のみられる筋線維が増加すると報告されている。これらのことから筋の形態と

*久留米大学保健体育センター

The Institute of Health and Physical Education, Kurume University

**愛知教育大学健康科学教室

Department of Health Science, Aichi University of Education

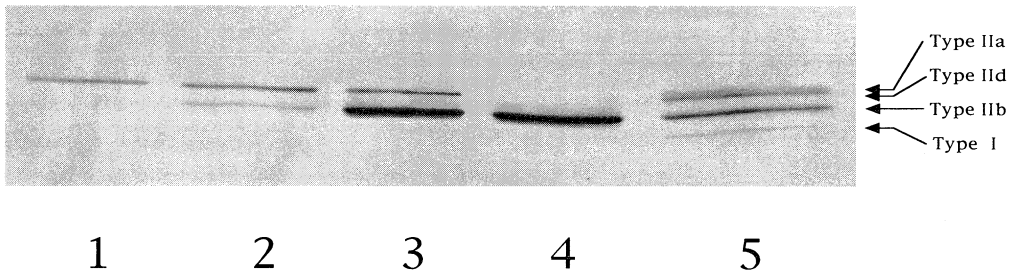


Fig. 1 Electrophoretograms of myosin heavy chain isoforms in single fiber on superficial portion from lateral gastrocnemius muscle (Only d-1; d and minor b-2; b and minor d-2; Only b-4; Marker protein-5)

HyHCアイソフォームの構成比には何らかの関係があるように思われる。

そこで本研究は組織化学的にタイプIIbとタイプIIdのみからなるラット腓腹筋外側部表層を用いて、単一筋線維でのミオシン重鎖構成比と筋横断面積の関係の有無について明らかにすることを目的とした。

方 法

実験には15週齢のFischer 344系雌ラット2匹より摘出した腓腹筋を用いた。なお飼育及び屠殺での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^{14),19)}。初めに、実体顕微鏡下で弛緩溶液中にて、腓腹筋の外側部表層より単一筋線維を無作為に摘出した。単一筋線維は筋節長がほぼ $2.6\mu\text{m}$ になる筋長で一回転捻った状態にて固定した。固定した単一筋線維の長軸に沿って直径の最大値と最小値を測定し、楕円近似により横断面積を求めた³²⁾。面積測定後、単一筋線維は電気泳動法により、MyHCアイソフォーム構成を同定した^{32),33),35)}。MyHCアイソフォーム構成比の分析は画像解析により行った^{33),35)}。図1に腓腹筋の外側部表層より摘出した単一筋線維において観察可能なMyHCの電気泳動パターンを示した。この電気泳動パターンは本研究及び先の研究³²⁾の単一筋線維サンプルより作成した。単一筋線維のMyHCアイソフォーム構成では、タイプIIb MyHCのみを含むPure IIb線維、タイプIIbとIIdのMyHCを含みタイプIIbの構成比が有意なHybrid IIb線維、タイプIIbとIIdのMyHCを含みタイプIIdの構成比が有意なHybrid IId線維、タイプIId MyHCのみを含むPure IIb線維の4タイプが観察される。本実験ではMyHCのIIbに注目し、この4タイプのうちPure IIbとHybrid IIb線維を分析に

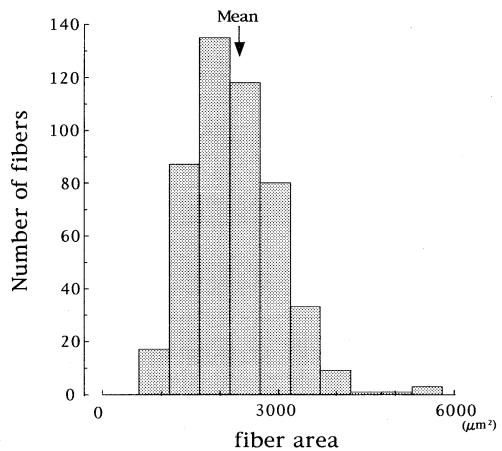


Fig. 2 Frequency distribution of fiber area (Whole muscle-histochemistry)

供した。次に他方の脚より摘出した腓腹筋から厚さ $10\mu\text{m}$ の切片を作成しMyosin ATPase染色(前処理pH10.3)を施した³⁴⁾。染色後、CCDカメラを接続した顕微鏡にて腓腹筋外側部表層の染色画像をコンピューターに取り込んだ。取り込んだ染色画像より筋線維(N=484)を無作為に選出して、NIH imageを用いて筋線維横断面積を求めた。単一筋線維の横断面積については、平均値と標準偏差を求めてF検定による分散の検定後、t検定を行った²¹⁾。

結 果

本実験に用いたラットの体重はそれぞれ175gと195gであった。腓腹筋の筋重量は878mgと922mgで、体重100gあたりの相対的な筋重量は502mgと473mgであった。図2に組織化学的分析による筋線維横断面積の分布を示した。組織化学的分析によ

Table 1 Mean fiber area of each typed single fiber at superficial portion of lateral gastrocnemius muscle in rats

Fiber type	Pure II b	Hybrid II b
Mean fiber area (μm^2)	3602	3075*
Range (μm^2)	1142-5794	1253-4634
Standard deviation (μm^2)	1050	978

*; Significant difference from the value in Pure II b
 Pure II b; fiber including only II b MyHC
 Hybrid II b; fiber including II b MyHC and minor II d MyHC
 MyHC; Myosin heavy chain

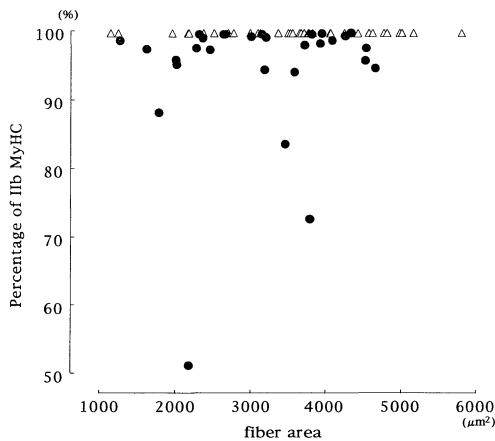


Fig. 3 Relationship between percentage of type II b MyHC and cross sectional area of each typed fiber
 △ - Pure II b fiber including only type II b MyHC
 ● - Hybrid II b fiber including type II b MyHC and minor type II d MyHC
 MyHC; Myosin heavy chain

図3にはMyHCアイソフォーム構成比と筋線維横断面積の関係を示した。これを見ると、混在の程度が大きい(IIbMyHC構成比が90%より少ない)筋線維は横断面積が比較的小さいことが示された。しかし、IIbMyHC構成比が90%以上であるが小さな面積の筋線維も多数観察された。Pure II bとHybrid II b両タイプの筋線維横断面積の分布域は広範囲であった。また両タイプの筋線維横断面積の分布域は重複していた。このことからMyHCアイソフォーム構成比と筋線維横断面積には明確な関係がみられなかった。

考 察

本研究では、Pure II b線維とHybrid II b線維の両タイプにおいてMyHCアイソフォーム構成比と筋線維横断面積に明確な関係はみられなかった。

筋線維の平均横断面積は筋線維タイプによる違いが報告されている。DelpとDuan⁵⁾はSD系の雄ラット腓腹筋白色部では、平均横断面積はIIb線維がII d/x線維に比べて大きいと報告し、それは他の四肢の筋についても同様であるとしている。Larssonら^{16),17)}、HämäläinenとPette⁹⁾、Sieckら²⁴⁾も同様にIIb線維の平均横断面積がII x線維に比べて大きいと報告している。我々³⁴⁾も先にラット腓腹筋外側部表層にてIIb線維がII d/x線維に比べて大きいと報告した。本研究では組織化学的にタイプII bと判定される線維で、II dMyHCの発現がみられる線維は平均横断面積が小さいことが明らかとなった。しかし、平均横断面積には差がみられるものの、両タイプの筋線維横断面積の分布をみると分布域が広範囲に広がっていた。また両タイプの分布域は重複がみられた。このことはPure II b線維とHybrid II b線維の両タイプにおいて、MyHCアイソフォーム

る筋線維横断面積は平均が $2259.3\mu\text{m}^2$ で、最大値が $5799\mu\text{m}^2$ 、最小値が $617\mu\text{m}^2$ 、標準偏差が $760\mu\text{m}^2$ であった。単一筋線維のMyHC構成比をみると、本研究で摘出した70本の内、Pure II b線維は39本(56%)であり、Hybrid II b線維は30本(43%)であった。単一筋線維のうち1本(1%)はHybrid II d線維であった。本実験ではPure II d線維は観察されなかった。表1にはPure II b線維とHybrid II b線維の横断面積の平均値及び分布域と標準偏差を示した。単一筋線維の平均横断面積では、Hybrid II b線維に比べPure II b線維が高値を示した。

構成比と筋線維横断面積には明確な関係がみられないことを示している。換言すると、横断面積の小さい線維においては、必ずしも II dMyHC の発現がみられるとは限らないことが明らかとなった。

これまで通常の状態での単一筋線維中におけるミオシンの混在については、多くの報告がみられる。Gauthier と Lowey⁷⁾ は免疫組織化学的手法を用いて、ラット横隔膜筋でファーストとスローミオシンの混在を報告している。Lutz ら¹⁸⁾ も免疫組織化学的手法を用いて、ウサギ前脛骨筋でファーストとスローミオシンの混在を報告している。ファーストのサブタイプの混在では、Biral ら³⁾ が電気泳動法を用いて、ヒト骨格筋において II a と II b ミオシンの混在を報告している。さらに Larsson ら¹⁶⁾ も免疫組織化学的手法を用いて、ラット前脛骨筋で II b と II d/x MyHC の混在を報告している。一方、トレーニング²²⁾ や代償性肥大²⁶⁾、サスペンション^{6),22),27)}、宇宙飛行²⁾ といった筋線維横断面積が大きく変化する場合に、MyHC の混在は増加することが報告されている。これらの場合、諸条件により引き起こされる神経系からの刺激の変化あるいは増減、ホルモンの量やメカニカルな刺激の変化が、タンパクの合成過程においてアイソフォーム発現のスイッチングを引き起こしミオシン重鎖の混在を増加させていると考えられる。骨格筋の肥大あるいは萎縮がみられる場合には、タンパク合成/分解のバランスとミオシン重鎖表現型の発現におけるスイッチングの両方に対して何らかの刺激が影響する結果として、形態の変化とミオシン重鎖の変化が同時期にみられるのであろう。今回のように通常の状態の骨格筋においては、そのような刺激がないため骨格筋の形態とミオシン重鎖アイソフォーム構成に何の関係もみられなかったと考えられる。

筋線維におけるミオシン表現型の決定には、筋を支配している神経が重要であると考えられている¹⁵⁾。発育のようにミオシンが新生仔型より成熟型に分化する過程においては、ミオシン表現型の決定に神経支配が重要であると報告されている¹⁾。また除神経¹⁰⁾ や交叉神経支配^{4),21)} によりミオシン表現型は大きく変化することが報告されている。さらに、プピバカインなどの薬物により破壊された筋線維の再生過程で、胚型や新生仔型より成熟型へのミオシン重鎖のスイッチングにおいて神経支配が重要であると報告されている^{11),23)}。これらのことから、本研究でみられたような単一筋線維中のミオシン重鎖の混在は、

除神経のような神経支配からの逸脱が通常の状態においても起こっている可能性が考えられる。あるいは筋線維の神経支配により決定されたミオシン重鎖の表現型に対して、ホルモンやメカニカルな刺激などによる修飾が行われている可能性も考えられる。本研究ではこれらについて言及することはできないが、この問題については詳細に検討し、単一筋細胞内で行われているタンパク表現型の決定のメカニズムを明らかにする必要があると考える。

要 約

本研究は、単一筋線維でのミオシン重鎖と筋線維横断面積の関係の有無について明らかにすることを目的とした。実験には15週齢の Fischer344系雌ラットより摘出した腓腹筋を用いた。初めに実体顕微鏡下で腓腹筋の外側部表層より単一筋線維を無作為に摘出し、横断面積を求めた。面積測定後、単一筋線維は電気泳動法により MyHC 構成を同定し、構成比を求めた。単一筋線維の横断面積では、Hybrid II b 線維に比べ Pure II b 線維が高値を示した。MyHC アイソフォーム構成比と横断面積の関係をみると、Pure II b と Hybrid II b の両タイプの筋線維横断面積の分布域は広範囲であり、かつ重複していた。このことから MyHC アイソフォーム構成比と筋線維横断面積には明確な関係がみられなかった。

引用文献

- 1) Adams, G. R., McCue, S. A., Zeng, M., and Baldwin, K. M. (1999): Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. *Am. J. Physiol.*, **276**, R954-R961.
- 2) Allen, D. L., Yasui, W., Tanaka, T., Ohira, Y., Nagaoka, S., Sekiguchi, S., Hinds, W. E., Roy, R. R., and Edgerton, V. R. (1996): Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after space flight. *J. Appl. Physiol.*, **81**(1), 145-151.
- 3) Biral, D., Betto, R., Danieli-Betto, D., and Salviati, G. (1988): Myosin heavy chain composition of single fibers from normal human muscle. *Biochem. J.*, **250**, 307-308.

- 4) Clark, K. I., and White, T. P. (1991) : Neuromuscular adaptations to cross-reinnervation in 12- and 29-mo-old Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.*, **260**, C96-C103.
- 5) Delp, M. D., and Duan, C. (1996) : Composition and size of type I, II A, II D/X, and II B fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **80**(1), 261-270.
- 6) Gardetto, P. R., Schluter, J. M., and Fitts, R. H. (1989) : Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **66**(6), 2739-2749.
- 7) Gauthier, G. F., and Lowey, S. (1979) : Distribution of myosin isoenzyme among skeletal muscle fiber. *J. Cell Biol.*, **81**, 10-25.
- 8) Gorza, L. (1990) : Identification of novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histchem. Cytochem.*, **38**(2), 257-265.
- 9) Hämaläinen, M., and Pette, D. (1993) : The histochemical profiles of fast fiber types II B, II D, and II A in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J. Histchem. Cytochem.*, **41**(5), 733-743.
- 10) Jakubie-Puka, A., Ciechomska, I., Morga, J., and Matusiak, A. (1999) : Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **122**(3), 355-362.
- 11) Jerkovic, R., Argentini, C., Serrano-Sanchez, A., Cordonnier, C., and Schiaffino, S. (1997) : Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle. *Cell Struct. Funct.*, **22**(1), 147-153.
- 12) Jiang, B., Roy, R. R., and Edgerton, V. R. (1990) : Enzymatic plasticity of medial gastrocnemius fibers in the adult chronic spinal cat. *Am. J. Physiol.*, **259**, C507-C514.
- 13) Jiang, B., Roy, R. R., Navarro, C., Nguyen, Q., Pierotti, Q., and Edgerton, V. R. (1991) : Enzymatic responses of cat medial gastrocnemius fibers to chronic inactivity. *J. Appl. Physiol.*, **70**(1), 231-239.
- 14) 実験動物飼育保管研究 (1980) : 実験動物の飼養及び保管等に関する基準の解説. 総理府内閣総理大臣官房管理室, ぎょうせい, 東京.
- 15) Kameda, N., Kobayashi, T., Park-Matsumoto, Y. C., Tsukagoshi, H., and Shimizu, T. (1998) : Developmental studies of the expression of myosin heavy chain isoforms in cultured human muscle aneurally and innervated with fetal rat spinal cord. *J. Neurol. Sci.*, **114**(1), 85-98.
- 16) Larsson, L., Ansved, T., Edström, L., Gorza, L., and Schiaffino, S. (1991) : Effects of age on physiological immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor unit in the rat. *J. Physiol.*, **443**, 257-275.
- 17) Larsson, L., Edström, L., Lindgren, B., Gorza, L., and Schiaffino, S. (1991) : MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.*, **261**, C93-C101.
- 18) Luts, H., Weber, H., Billeter, R., and Jenny, E. (1979) : Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibers of adult rabbits. *Nature*, **281**, 142-144.
- 19) 前島一淑, 江崎考三郎, 篠田元扶, 山内忠平, 光岡知足, 菅野 茂, 辻 茂, 土井邦雄 (1988) : 新実験動物学. 朝倉書店, 東京.
- 20) Matoba, H., Allen, J. R., Bayly, W. M., Oakley, C. R., and Gollnick, P. D. (1985) : Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. *Histochemistry*, **82**, 175-183.
- 21) 森 敏昭, 吉田寿夫 (1990) : 心理学のためのデータ解析テクニカルブック. 北大路書房, 京都.
- 22) Oishi, Y., Ishihara, A., Yamamoto, H.,

- and Miyamoto, E. (1998) : Hindlimb suspension induces the expression of multiple myosin heavy chain isoforms in single fibres of the rat soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **62**(2), 127-134.
- 23) Schiaffino, S., Serrano, A. L., Jakovic, R., DiLisi, R., and Murgia, M. (1998) : Neural regulation of myosin gene expression in regenerating skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **163**(3), S11-S15.
- 24) Sieck, G. C., Zhan, W. Z., Prakash, Y. S., Daood, M. J., and Watchko, J. F. (1995) : SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol.*, **79**(5), 1629-1639.
- 25) Staron, R. S., Gohlsh, B., and Pette, D. (1978) : Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Physiol.*, **408**, 444-450.
- 26) Sugiura, T., Miyata, H., Kawai, Y., Matoba, H., and Murakami, N. (1993) : Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscles. *Int. J. Biochem.*, **25**(11), 1609-1613.
- 27) Talmadge, R. J., Roy, R. R., and Edgerton, V. R. (1996) : Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, **81**(6), 2540-2546.
- 28) Talmadge, R. J., Roy, R. R., and Edgerton, V. R. (1996) : Persistence of hybrid fibers in rat soleus after spinal cord transection. *Anat. Rec.*, **255**(2), 188-201.
- 29) Termin, A., Staron, R. S., and Pette, D. (1989) : Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscle; a single fiber study. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 749-754.
- 30) Termin, A., Staron, R. S., and Pette, D. (1989) : Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, **92**, 453-457.
- 31) Thomas, P. E., and Ranatunga, K. W. (1993) : Factors affecting muscle fiber transformation in cross-reinnervated muscle. *Muscle Nerve*, **16**(2), 193-199.
- 32) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛 (1993) : ラット腓腹筋外側部での加齢及びトレーニングによる変化. *体力科学*, **43**(6), 623.
- 33) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克, 石河利寛 (1993) : 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*, **44**(1), 97-104.
- 34) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克 (1996) : ラット腓腹筋外側部表層における筋線維及び毛細血管の老化による変化. *名古屋経済大学・市邨学園短期大学 自然科学研究会誌*, **31**(1), 1-13.
- 35) 辻本尚弥, 鈴木英樹, 春日規克 (1998) : 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紀要*, **6**, 21-28.