

DB
1118
1995
(H6)

博 士 論 文

筋細胞内のミオシンタンパクの分布
および持続的な運動によるその変化

平成6年度

和田 正信

指導教官
勝田 茂 教授

筑波大学

寄 贈	
勝田茂氏	平成 年 月 日

90094988

目 次

I. 緒 言	*****	1
II. 文献研究	*****	4
1. 筋線維の分類と構造	*****	4
A 筋線維の分類	*****	4
a-1 酸化的・解糖的代謝能力に基づく分類	***	4
a-2 mATPase活性に基づく分類	*****	6
B 収縮タンパク	*****	11
b-1 アクチン	*****	11
b-2 ミオシン軽鎖	*****	12
b-3 ミオシン重鎖	*****	17
b-4 アイソミオシン	*****	22
C 組織化学的に分類される筋線維タイプと ミオシンとの関係	*****	28
2. 筋線維の収縮特性に関与する要因	*****	31
A ミオシン	*****	31
B その他の要因	*****	34
3. 筋線維と運動パフォーマンス	*****	37
A 筋線維組成と運動能力	*****	37
a-1 持久能力との関係	*****	37

a-2	収縮速度および筋力との関係	*****	40
a-3	回復力との関係	*****	41
B	スポーツ選手の筋線維組成	*****	41
4.	収縮活動量増加に伴う筋線維の変化	*****	45
A	mATPaseの組織化化学的特性により 分類される筋線維タイプの変化	*****	45
B	ミオシン重鎖および軽鎖の変化	*****	50
C	筋線維のタイプ移行を引き起こす要因	****	52
III.	研究目的および研究課題	*****	55
IV.	高強度・持久トレーニングによる筋線維組成 およびミオシン軽鎖の変化（実験 I）	*****	57
1.	目的	*****	57
2.	方法	*****	58
A	実験動物およびトレーニング	*****	58
B	組織化学的分析	*****	59
C	電気泳動	*****	59
3.	結果	*****	61
A	筋線維組成	*****	62
B	ミオシン軽鎖	*****	62
4.	考察	*****	62
5.	要約	*****	68

V. 協同筋切除によるミオシン重鎖および軽鎖の		
変化 (実験 II)	*****	69
1. 目的	*****	69
2. 方法	*****	70
A 実験動物および協同筋の切除	*****	70
B 電気泳動	*****	71
3. 結果	*****	72
A ミオシン重鎖の分離パターン	*****	72
B slow type 重鎖および軽鎖の変化	*****	72
C fast type 重鎖および軽鎖の変化	*****	74
4. 考察	*****	74
5. 要約	*****	80
VI. ラットおよびラビットの単一筋線維における		
ミオシン軽鎖の分布 (実験 III)	*****	82
1. 目的	*****	82
2. 方法	*****	83
A 実験動物、単一筋線維の剥離および筋タンパクの抽出	*****	83
B ミオシン軽鎖の分離	*****	84
C ミオシン重鎖の分離	*****	85
D ゲルの染色およびミオシン軽鎖の定量	*****	85
3. 結果	*****	85

A	単一筋線維に発現しているミオシン重鎖	***	85
B	ラット単一筋線維における ミオシン軽鎖の分布	*****	87
C	ラビット単一筋線維における ミオシン軽鎖の分布	*****	87
4.	考 察	*****	92
5.	要 約	*****	95
VII.	ラビット単一筋線維におけるアイソミオシンの分布 (実験IV)	*****	97
1.	目 的	*****	97
2.	方 法	*****	99
A	実験動物および筋タンパクの抽出	*****	99
B	ミオシン重鎖の分離	*****	99
C	アイソミオシンの分離	*****	100
D	染色および定量	*****	101
3.	結 果		
A	単一筋線維に発現しているミオシン重鎖	***	101
B	全筋および単一筋線維における アイソミオシン	*****	101
C	単一筋線維におけるアイソミオシンの分布	**	103
4.	考 察	*****	109
5.	要 約	*****	112
VIII.	ヒト骨格筋におけるミオシン重鎖と軽鎖の親		

和性（実験V）	*****	115
1. 目的	*****	115
2. 方法	*****	116
A 被検者および筋の採取	*****	116
B 組織化学的分析	*****	116
C 電気泳動	*****	117
D ミオシン軽鎖の相対的分布比率の算出	****	118
3. 結果	*****	119
A 二次元電気泳動パターン	*****	119
B 筋線維組成およびミオシン軽鎖の分布	****	119
C 筋線維組成とミオシン軽鎖の アイソフォームの関係	*****	119
4. 考察	*****	123
5. 要約	*****	127
IX. 討 論	*****	129
X. 総 括	*****	135
XI. 結 論	*****	140
謝 辞	*****	141
参考文献	*****	142
参考論文	*****	163

List of tables

- Table 1. Distinct classifications of skeletal muscle fiber based on myofibrillar actomyosin ATPase (mATPase).
- Table 2. Various myosin light chain (LC) isoforms in mammalian muscles.
- Table 3. Various myosin heavy chain (HC) isoforms in mammalian muscles.
- Table 4. Rat skeletal muscle isomyosins and their subunit composition.
- Table 5. Myosin light chain (LC) and heavy chain (HC) isoforms in histochemically typed fiber from rodent skeletal muscle.
- Table 6. Programs of progressive endurance training.
- Table 7. Comparison of relative muscle fiber composition (%) in control and trained groups.
- Table 8. Percentage distribution of myosin light chain (LC) isoforms in the soleus muscle of control and trained rats.
- Table 9. Percentage distribution of myosin light chain (LC) isoforms in the extensor digitorum longus muscle of control and trained rats.
- Table 10. Relative concentration of the fast alkali light chain LC3f in three fast fiber types from rat extensor digitorum longus muscle.
- Table 11. Relative concentration of the fast alkali light chain LC3f in two fast fiber types from rabbit extensor digitorum longus muscle.
- Table 12. Percentage distribution of FM1, FM2, and FM3 isomyosins in pure type IIA, type IID, and type IIB fibers of the rabbit as determined by densitometric evaluation of silver-stained electrophoreses.
- Table 13. Mean (\pm SD) and range for percentage of fiber type area and the molar ratio of myosin light chain (LC) isoforms in human vastus lateralis muscle.

List of figures

- Fig. 1. Schematic illustration of histochemically staining patterns for myofibrillar actomyosin adenosine triphosphatase after preincubation (PI) at different pH.
- Fig. 2. Schematic illustration of myosin molecule in the vertebrate skeletal muscle.
- Fig. 3. Schematic illustration of the mouse gene encoding the two myosin alkali light chains of fast skeletal muscle.
- Fig. 4. Schematic illustration of the electrophoretic mobilities of isomyosin triplets in adult rat skeletal muscle.
- Fig. 5. Maximal oxygen uptake and lactate threshold in relation to muscle fiber composition in human skeletal muscle.
- Fig. 6. Muscle fiber composition in skeletal muscle of elite sport players.
- Fig. 7. Time dependent changes in percentage distribution of histochemically classified fiber types in low-frequency-stimulated (12 hours daily) rabbit EDL muscle.
- Fig. 8. Increased contractile activity-induced transformation of histochemically typed fiber in rodent (a) and human (b) muscle.
- Fig. 9. Electrophoretically separated myosin heavy chain isoforms in adult rat plantaris muscle.
- Fig. 10. Changes in the relative distribution of slow-type light chain (LC1s and LC2s; a) and HCl isoforms (b) in the plantaris muscle as a function of time following removal of synergists.
- Fig. 11. Changes in the relative distribution of fast-type HClIA (a), HClID (b), HClIB (c), and HClIB' isoforms (d) in the plantaris muscle as a function of time following removal of synergists.
- Fig. 12. Changes in the LC3f / LC1f ratio of the plantaris muscle as a function of time following removal of synergists.
- Fig. 13. Separation of myosin heavy chain isoforms in single fibers from rat extensor digitorum longus muscle by gradient polyacrylamide gel electrophoresis.

- Fig. 14. Silver-stained two-dimensional electrophoresis of extracts from single type IIB (a), type IID (b), and type IIA (c) rat muscle fibers.
- Fig. 15. Histograms of the relative concentration of LC3f in microdissected pure type IIB, IID, and IIA fibers of rat extensor digitorum longus muscle.
- Fig. 16. Electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms in pure and hybrid single fibers of rabbit muscles.
- Fig. 17. Electrophoretic separation of isomyosin in extracts from extensor digitorum longus and psoas muscles, and of a single type IIB fiber.
- Fig. 18. Electrophoretic separation of isomyosin in extracts from extensor digitorum longus and psoas muscles, and of a single type IIA fiber.
- Fig. 19. Electrophoretic separation of isomyosin in single type IIA, type IIB, and type IID fibers.
- Fig. 20. Electrophoretic mobilities of fast isomyosin triplets on gel.
- Fig. 21. Histogram of percentage distribution of FM3d in pure single type IID fibers of rabbit muscle.
- Fig. 22. Two-dimensional electrophoresis of human skeletal muscle with 53.0 % type I fiber area.
- Fig. 23. The relationship between the percentage of type I fiber area and molar ratio of slow myosin light chain (LC1s and LC2s) to total myosin light chain.
- Fig. 24. The relationship between the ratio of percentage of type IIA fiber area to that of type II fiber area and the molar ratio of LC1f to fast alkali light chain (LC1f and LC3f).

略語と記号

本論文で用いる主な略語と記号は以下の通りである。

alkali LC	: alkali myosin light chain LC1f、LC3f、LC1saおよびLC1sbの総称
AM	: adductor magnus 大内転筋
ATP	: adenosine triphosphate アデノシン三リン酸
[ATP]	: アデノシン三リン酸の濃度
ATPase	: adenosine triphosphatase アデノシントリフォスファターゼ
β -GPA	: β -guanidinopropionic acid β -グアニジノプロピオニック酸
[Ca ²⁺]	: カルシウムの濃度
DNA	: deoxyribonucleic acid デオキシリボ核酸
DTNB	: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTNB LC	: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) myosin light chain LC2fおよびLC2sの総称
EDL	: extensor digitorum longus 長指伸筋
eM	: embryonic myosin 胎生期の筋において特有に存在するミオシン

FG線維	: fast-twitch glycolytic fiber 酸化的代謝能力は低いが解糖的代謝能力に優れる速筋線維
FOG線維	: fast-twitch oxidative glycolytic fiber 酸化的代謝能力、解糖的代謝能力ともに高い速筋線維
FM	: fast myosin fast type ミオシン軽鎖 (LC)とfast type ミオシン重鎖 (HC) からなるミオシン分子
FT線維	: fast-twitch fiber 速筋線維
HC	: myosin heavy chain ミオシン重鎖
HMM	: heavy meromyosin トリプシンで切断したミオシン分子の頭部の部分
IEF	: isoelectric focusing 等電点
IM	: intermediate myosin 非変性条件下の電気泳動によりSMとFMの間に分画されるミオシン
Km	: ミカエリス定数
LC	: myosin light chain ミオシン軽鎖
LDH	: lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素
LMM	: light meromyosin トリプシンで切断したミオシン分子の尾部の部分

mATPase	: myofibrillar actomyosin adenosine triphosphatase 筋原線維アクトミオシン・アデノシントリフォスファターゼ
mRNA	: messenger ribonucleic acid メッセンジャーリボ核酸
NADH-TR	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase 酸化代謝能力の指標となる酵素の1つ
nM	: neonatal myosin 幼若期の筋において特有にみられるミオシン
PA	: parvalbumin パルブアルブミン
PS	: psoas 腰筋
PPi-PAGE	: pyrophosphate polyacrylamide gel electrophoresis ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動
S	: subfragment サブフラグメント ミオシン分子のHMMの部分をいい、ヘッドを含むS-1 と含まないS-2の2つの部分に分けられる
SDH	: succinate dehydrogenase コハク酸脱水素酵素
SDS	: sodium dodecylsulfate ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気 泳動
SO線維	: slow-twitch oxidative fiber

解糖的代謝能力は低いが酸化的代謝能力に優れる遅筋線維

- SM** : slow myosin
slow type ミオシン軽鎖 (LC) とslow type ミオシン重鎖 (HC) からなるミオシン分子
- SR** : sarcoplasmic reticulum 筋小胞体
- SOL** : soleus ヒラメ筋
- ST線維** : slow-twitch fiber 遅筋線維
- type I 線維** : 遅筋線維
- type II 線維** : 速筋線維
- type IIA 線維** : 速筋線維のサブグループでHCIIAを発現しているもの
- type IIB 線維** : 速筋線維のサブグループでHCIIBを発現しているもの
- type IIB/D 線維** : 組織化学的染色により分類され、従来type IIB 線維と呼ばれていたものには、HCの組成からはHCIIBを発現しているものとHCIIDを発現しているものの2種類が含まれている。本論文ではHCの種類から分類されるtype IIB 線維とtype IID線維とを区別するために、組織化学的手法から類別されるtype IIB 線維をtype B/D 線維と記す
- type IID 線維** : 速筋線維のサブグループでHCIIDを発現しているもの
- Vmax** : maximum shortening velocity 最大収縮速度

本論文は以下に示す論文によって構成されている。

和田正信, 勝田 茂 (1988) 高強度・持久トレーニングによるラット骨格筋タンパクの変化. 体育学研究 32: 221-229.

Wada, M., Katsuta, S., Doi, T. and Kuno, S. (1990) Favourable associations between the myosin heavy-chain and light-chain isoforms in human skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 416: 689-693.

Wada, M., Kikuchi, K. and Katsuta, S. (1992) Changes in myosin heavy-chain and light-chain isoforms following sustained exercise. In: Sato, Y., Poortmans, J., Hashimoto, I. and Oshida, Y. (Eds.) *Integration of Medical and Sports Sciences*. Karger, Basel, pp 309-317.

Wada, M. and Pette, D. (1993) Relationships between alkali light-chain complement and myosin heavy-chain isoforms in single fast-twitch fibers of rat and rabbit. *Eur. J. Biochem.* 214: 157-161.

Wada, M., Hamalainen, N. and Pette, D. (1994) Isomyosin patterns of single type IIB, IID, and IIA fibres from rabbit skeletal muscle. (submitted).

I. 緒 言

運動を行なう際、身体移動の直接のエネルギー源は骨格筋の収縮から得られ、スポーツ種目によっては主働筋の収縮・代謝特性が個々の競技レベルを大きく左右する傾向にあり、そのことは陸上競技に代表される技術系の関与が相対的に小さいスポーツ種目において顕著であると思われる。これは、そのようなスポーツ種目において優れた競技成績を収めるためには、筋の特性を望ましい方向に大きく変化させることが必然的に求められることを意味しており、これまで種々のトレーニングあるいは収縮活動量の変化に伴う骨格筋の組織化学的 (Andersen & Henriksson, 1977; Green et al., 1984; Sjostrom et al., 1987)、生化学的 (Pette et al., 1976; Brown et al., 1983; Simoneau et al., 1987)、生理学的な変化 (Salmons & Vrbova, 1969; Pette, et al., 1976) について広範に渡る研究が行なわれてきた。

これまでの研究から明らかになったことの一つは、筋細胞内のほとんどのタンパクが極めて高い可塑性を持っており、その変化は量的な側面にとどまらず、質的なものにまで及ぶということである。特に、持久的なトレーニング、協同筋の切除あるいは電気刺激などにより収縮活動量が増加すると、多くの細胞構成物は変化の時相こそ違え、劇的な変容を示すことが明らかになっている。これらの中で量的に著しい変化がみられるのは、酸化的リン酸化に関与する酵素群であり、他の多くのタンパクの変化率が数パーセントからせいぜい十数パーセントなのに対して、数倍もの増加が生ずる場合があることが報告されている (Reichmann et al., 1985)。また、質

的变化の代表的な例としては乳酸脱水素酵素 (LDH) のアイソフォームの分布変化があげられ、ピルビン酸に対する K_m が最も低いLDH5が減少し、 K_m が最も高いLDH1が増加することが知られている (Pette, 1986)。これらの変化はいずれも筋が疲労に対して高い耐性を獲得することに大きく寄与している。

ミオシンフィラメントおよびアクチンフィラメントの収縮機構の変化は、それが筋の収縮速度あるいは発揮可能な張力の大小に大きく影響することなどに招来して、スポーツ・健康科学の分野においても高い関心を集めてきた。これまで持久性・スプリントトレーニング、脱神経、交叉神経支配、後肢宙づり、発育、老化などに伴う変化が研究されてきたが、それらの多くは筋原線維に存在する筋原線維アクトミオシン・アデノシントリフォスファターゼ (mATPase) のpHに対する感受性に基づいて組織化学的に検討したものである。この方法で感知されるものはミオシン重鎖 (HC) のアイソフォームの分布変化のみであり (Staron & Pette, 1986)、しかもその分析感度は十分に高いとはいえないことが指摘されている (Termin et al., 1989b)。

mATPaseはHCにあるため、ミオシン軽鎖 (LC) は収縮特性にほとんど影響を及ぼさないと考えられてきた (Brown et al., 1983; Lowey, 1986)。しかしながら、近年単一筋線維の収縮速度を検討した報告において (Sweeney et al., 1988; Moss et al., 1990)、alkali LC (LC1s、LC1fおよびLC3f) が今まで考えられてきたより、大きく収縮特性に関与していることが指摘されるようになった。したがって、細胞内に分布するミオシンの

アイソフォームから、収縮特性の変化を類推しようとする場合、HCはもとよりLCについても詳細に検討する必要があると思われる。

本研究では、持続的な運動に伴うHCおよびLCの変化の詳細、および単一筋線維におけるそれらのアイソフォームの分布について検討したが、これらの生化学的データは、生理学的にも、また変化を生ずる作用機序を明らかにしていくうえでも意義のあるものであると思われる。

II. 文献研究

1. 筋線維の分類と構造

A 筋線維の分類

筋の色調に関する報告は、1873年にRanvier (1873) によってなされたものが最初だとされている。彼はその中で「赤色」を呈するものとそれに対してどちらかという「白色」を呈するものの2種類が存在することを記述しており、ここに筋線維の分類の起源をみることができる。以後、様々な分類法が提唱されてきたが、「客観的に筋線維を分類できること」、「分類が筋線維の機能的・構造的な違いをよく反映していること」、「分類を行うための手続きが簡便であること」などに起因して、現在ではmATPaseの活性に基づく分類法が広く用いられている。以下に筋線維の分類について述べる。

a-1 酸化的・解糖的代謝能力に基づく分類

筋あるいは筋線維にみられる色調の違いは、ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素の代謝経路に関与する組織に存在する鉄分の量的な差異に起因することが明らかになっている。組織化学的に代謝能力に基づいてより明確に筋線維を分類しようとする場合は、クエン酸回路や電子伝達系内の酵素あるいはEmbden-Meyerhofの解糖経路内の酵素などが指標として用いられてきた。Stein & Padykula (1962) はコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性

の差異によりラット骨格筋線維を3種類に分け、染色反応の弱い順にtype A、B、C 線維と、またEdgerton & Simpson (1969) は同様の染色反応からそれらをwhite、intermediate、red 線維と呼んだ。

一方、解糖系代謝能力の指標としては、LDHやフォスホリラーゼを用いる試みがなされたが、細胞質内に存在するこれらの酵素は染色中に細胞から逸脱してしまうため、染色反応が細胞が本来持つ真の性質を反映しないという問題点が明らかになった (Baldwin et al, 1973; Peter, 1971)。そこで、ミトコンドリアの膜に結合するフラボタンパクである α -グリセロリン酸脱水素酵素が用いられるようになった。この酵素は α -グリセロリン酸シャトルに役割を担い解糖系の主経路におけるものではないが、活性値が解糖能力と極めて高い相関関係にあることが示されている (Pette & Bucher, 1963; Pette, 1966)。mATPaseとこれら代謝能力を示す酵素染色を組み合わせ、齧歯類骨格筋を slow-twitch oxidative (SO)、fast-twitch oxidative glycolytic (FOG)、fast-twitch glycolytic (FG) の3タイプに分類する方法がPeter et al. (1972) によって提唱されており、この分類法はこれまで広く用いられてきた。

しかしながら、代謝能力から筋線維を分類することには幾つかの問題点がある。第一は齧歯類の骨格筋では、酸化的代謝能力の高いいわゆる「red fiber」全てがslow-twitch fiberではないことである。第二は、酸化的代謝能力は解剖学的に同じ筋であっても種が異なれば、また同一の個体であっても筋が異なれば大きな差異があり、oxidativeかそうでないかの判定が筋切片内の相対的評価によって行われる場合、類似した酸化的代謝能

力を有する筋線維が種によってあるいは筋によって、異なるタイプに分類されることがある点である。第三は、染色反応強度は連続的であるため客観的にそれらを2分することに困難が伴うことである (Romanul, 1964)。

a-2 mATPase活性に基づく分類

ATPaseの活性はこの酵素の働きによって産生される無機リン酸をカルシウムで沈殿させた後、コバルトと硫化アンモニウムで処理し硫化コバルトを形成することによって、組織化学的に可視化することができる (Padykula & Herman, 1955)。骨格筋の切片にこの方法を施し得られた活性には、ミトコンドリアの持つATPaseは関与しないこと、および筋小胞体 (SR) の持つATPaseの関与率は5%以下であることが明らかになっており (Mabuchi & Sreter, 1980)、したがってこれがmATPaseをよく反映しているとみなすことができる。

mATPaseの活性は種々の要因により変化するが、pHに対する応答については詳細な検討がなされてきた。Sreter et al. (1966) およびSeidel (1967)によって、速筋と遅筋とでアルカリや酸に対する生化学的なmATPase活性の感受性が異なることが、またDrews & Engel (1966)およびGuth & Samaha (1969) によっては、組織化学的に酸に対しては活性を失わないがアルカリに対して失活する筋線維と、全くその逆の反応を呈するものの2種類があることが示され、これらがmATPaseに基づく筋線維の分類の先駆けとなった。酸に対して安定したmATPaseを有する線維はtype I 線維と、一方アルカリに対して安定している線維はtype II 線維と命名され

るとともに (Drews & Engel, 1966)、収縮特性の関連からtype I 線維は遅筋 (ST) 線維と、type II 線維は速筋 (FT) 線維とも呼ばれるようになった (Barnard et al., 1971;表 1)。

Brooke & Kaiser (1969, 1970a, 1970b) はpHに対する感受性についてのさらに詳細な検討から、type II 線維を3種類のサブタイプに分け、pH 4.6のpreincubationで活性を完全に失うものをtype IIA 線維と、同じpHに対して弱い活性を示すものをtype IIB 線維と、pH 10.3~4.3の全ての領域において活性を失わないものをtype IIC 線維と命名した (図 1;表 1)。このpHに対するmATPaseの失活の度合からのタイプ分け、およびtype I、type IIA、type IIB、type IICという呼称が、mATPaseに基づく筋線維の分類法としては最もよく用いられてきた。

酸性preincubationにおけるtype II 線維のmATPaseの変化の度合は、pHに極めて大きく依存することは事実であるが、それだけではなくpreincubation溶液中のイオン組成やバッファーの種類にも影響を受ける。ハロゲン族元素ではpH 4.6における失活の速度は $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ の順で大きい (Matoba & Gollnick, 1984)、この順序がミオシンの等電点 (IEF) の変化の度合 (Sarkar, 1950) やポリアクリルアミドへの結合の強さ (von Hippel et al., 1973) と同じであることは興味深い。この他にもtype II 線維のmATPaseは、ホルムアルデヒド (Guth & Samaha, 1969)、マグネシウム (Mabuchi & Sreter, 1980)、あるいは銅 (Gollnick & Matoba, 1984) など多くの要因により変化することが示されており、それらに基づく分類方法もある (表 1)。

Table 1. Distinct classifications of skeletal muscle fiber based on myofibrillar actomyosin ATPase activity (mATPase). Slow-twitch, B, and I fibers are thought to be identical. Type IMM and ISM fibers are slow-twitch fibers that exist in the mixed muscle and in the soleus muscle, respectively. The staining pattern of type IMM fibers for mATPase after acid preincubation is different from that of type ISM fibers. A complete correspondence appears not to exist among any fast-twitch fiber subgroups identified on the basis of the different criteria for classifications with the exception of the subgroups of Brooke & Kaiser, and Mabuchi & Sreter. Although the staining methods used in their studies were not the same, type IIA and IIB fibers on the one hand are identical with type IIA and type IIB fibers on the other hand. Type IIX fibers are synonymous with type IID fibers.

Nomenclature	Animal	Criterion for classification	Reference
I & II	Human	a, c	Drews & Engel (1966)
Slow-twitch & Fast-twitch	Guinea pig	a	Barnard et al. (1971)
Slow-twitch & Fast-twitch	Human	a	Gollnick et al. (1972)
A, B & C	Rat	b	Samaha et al. (1970)
I, IIA, IIB & IIC	Rat, Rabbit & Human	c	Brooke and Kaiser (1970b)
I, IIA & IIB	Rat, Rabbit & Human	d	Mabuchi & Sreter (1980)
IMM, ISM, IIA1, IIA2 & IIA3	Rat	e, f	Gollnick et al. (1983)
I, IIA, IIB & IIX	Rat, Mouse & Guinea pig	b, c	Gorza (1990)
I, IIA, IIB & IID	Rat, Rabbit, mouse & Guinea pig	b, c	Hamalainen & Pette(1993)

a, mATPase activity at pH 9.4 without preincubation.

b, Sensitivity to formalin and alkali preincubation.

c, Sensitivity to acid and alkali preincubation.

d, Mg-Ca stimulated mATPase activity at pH 9.4.

e, Time course of activation and inactivation during acid preincubation.

f, Sensitivity to copper.

pH of PI	Fiber Type			
	I	IIC	IIA	IIB
pH 10.3	○	●	●	●
pH 4.6	●	●	○	◐
pH 4.3	●	●	○	○

Fig. 1. Schematic illustration of histochemically staining patterns for myofibrillar actomyosin adenosine triphosphatase after preincubation (PI) at different pH. (According to Brooke and Kaiser, 1970a and b)

例えば、Gollnick et al. (1983, 1986) はラット骨格筋においてpH 4.35に対するmATPase活性の経時的変化について検討し、失活速度の異なる3種類のtype II 線維が存在することを観察し、速度の早い順にtype IIA1、IIA2、IIA3 線維と呼んだが(表1)、これはBrooke & Kaiser (1969, 1970a, 1970b) が示すtype IIA、IIB、IIC 線維と対応するものではない。また、彼らはヒラメ筋のtype I 線維と足底筋のtype I 線維とで組織化学的なmATPase活性が異なることも示しており(Gollnick et al., 1983)、これらはいずれも従来考えられているより多くの種類のミオシンが存在する可能性を示唆するものである。

近年、Brooke & Kaiser (1969, 1970a, 1970b) の示すtype IIB 線維をさらに2種類にタイプ分けできることが認められている。細分された一方の線維にはtype IIB 線維の名称がそのまま用いられているが、もう一方の線維には、Petteらの研究グループ(Bar & Pette, 1988; Termin et al., 1989b; Ainger et al., 1993)によってtype IID 線維と、それに対してGorza (1990) によっては同一のものをtype IIX 線維と命名された(表1)。以後、本論文ではPetteらのネーミングを用いることにする。このようにtype IID 線維を同定できるようになったのは比較的最近のことであり、組織化学的な先行研究の多くにおいてtype IIB 線維といった場合、Brooke & Kaiser (1969, 1970a, 1970b) の分類方法に準じているため、それらはPetteら(Bar & Pette, 1988; Termin et al., 1989b; Ainger et al., 1993)あるいはGorza (1990) が示すtype IIB 線維とtype IID 線維をひとまとめにしたものを指す。本論文ではtype IIB 線維とtype IID 線維とを区別するために、Brooke &

Kaiser (1969, 1970a, 1970b) のいうtype IIB 線維を指す場合、type IIB/D 線維と記すことにする。なお、type IID 線維は齧歯類にのみみられ、ヒトの骨格筋において発見されたという報告は現在までなされていない。

Gollnick et al. (1983) の示すtype IIA1、IIA2、IIA3 線維とTermin et al. (1989b) の示すtype IIA、IIB、IID 線維とが、どのような対応関係にあるのかについては明らかではない。しかしながら、1種類のfast type ミオシン重鎖 (HC) しか発現していないヒラメ筋に (Termin et al. 1989b)、type IIA1 線維と type IIA2 線維が存在することを示すGollnick et al. (1983) の報告からは、異なる方法によって分類されるそれぞれの3タイプの筋線維は少なくとも完全には対応しないと結論される。

B 収縮タンパク

b-1 アクチン

アクチンは筋原線維タンパクの約20%を占め、直径約7nmの細いフィラメントの主要構成物である。これらはG-アクチンと呼ばれるやや細長い球状(5×4×3nm)のアクチン分子が適当なイオンコンディション下において2本がらせん状に重合したものであり、フィラメント状のものをF-アクチンという。らせんの1ピッチは76nmであり、その中に13個のG-アクチンが配列している。G-アクチンは分子量約42Kダルトンであり、375個のアミノ酸から構成されていることが明らかになっている。

アクチンにはIEFの異なる α 、 β 、 γ の3種類のアイソフォームがあり、 α は心筋、骨格筋、大動脈に、 β と γ は非筋細胞や平滑筋に存在する。筋

芽細胞の時期には β と γ が多く発現しているが、筋管へと成長する過程においてこれらは減少し、代わって α が主成分となる。筋の発育の初期の段階では異なる2種類の α -アクチンのアイソフォームが発現しているが、成熟した個体では1種類の α -アクチンしかみられない。ミオシンとは異なり、type I、IIA、IIB/D 線維に含まれるアクチンは全て同一のものであると考えられている (Billeter et al., 1982)。

b-2 ミオシン軽鎖

直径約15nmのミオシンフィラメントは、多数のミオシン分子が極性をもって重合したものであり、ミオシン1分子は分子量約200KダルトンのHC 2分子と分子量20Kダルトン前後のLC 4分子から構成されている(図2)。成熟した齧歯類の骨格筋においては、速筋線維に特異的に存在するLC (LCf) と遅筋線維にのみみられるLC (LCs) がある。LCfにはさらに3種類のアイソフォームがあり、それらは分子量の大きい順にLC1f、LC2f、LC3fと呼ばれている。LCsにも3種類のアイソフォームがあり、LC1sa、LC1sb、LC2sという(表2)。LC1saとLC1sbとでは分子量はほぼ等しいが、IEFが異なり、LC1sbの方が酸性側に位置する。

LC2 (LC2f、LC2s) はディチオビスニトロベンゾイック酸 (DTNB) 溶液中においてHCから解離することから、それらを総称してDTNB LCと、それに対してLC1 (LC1f、LC1sa、LC1sb) とLC3fはアルカリ溶液中で解離が起こることから、alkali LC と呼ばれている。また、LC2はカルモジュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼによって磷酸化 (phosphorylatable) さ

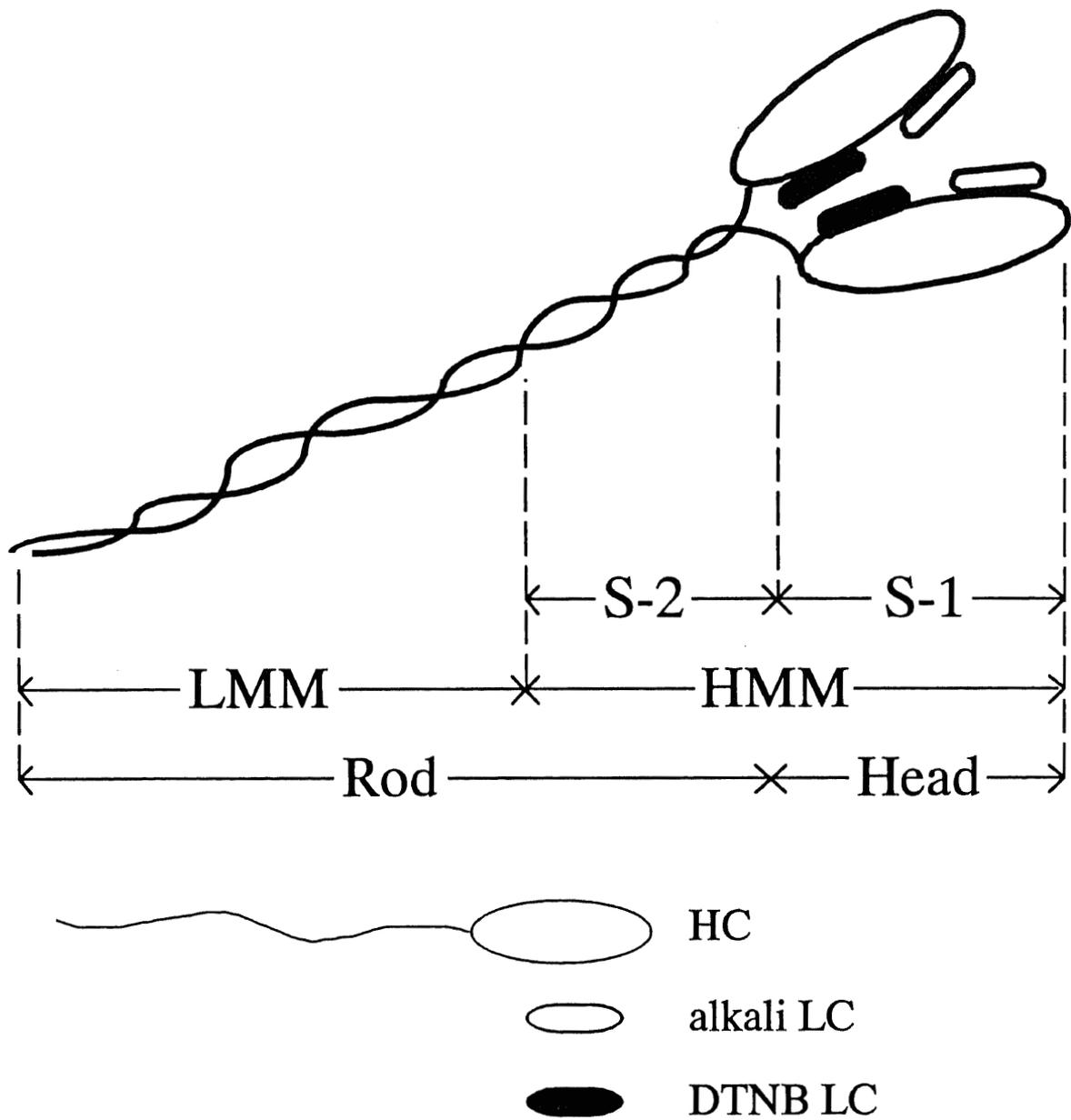


Fig. 2. Schematic illustration of myosin molecule in the vertebrate skeletal muscle. All muscle myosins share the same basic substructure. Abbreviations: *LC*, myosin light chain; *HC*, myosin heavy chain; *DTNB*, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); *LMM*, light meromyosin; *HMM*, heavy meromyosin; *S*, subfragment.

Table 2. Various myosin light chain (LC) isoforms in mammalian muscles. The LC1sb of the masseter muscle is antigenetically different from the LC1sb of the slow-twitch muscle in rabbit. The "g" of myosin light chain in the smooth / non-muscle is an abbreviation of gizzard muscle. In the rodent muscle, LC1sb, LC2s, and LC1emb seem to be identical with LC1v, LC2v, and LC1a, respectively.

Sources	Nomenclature	References
Skeletal muscle		
Fast-twitch	LC1f, LC2f & LC3f	Pette et al. (1976)
Slow-twitch	LC1sa, LC1sb & LC2s	Pinter et al. (1981)
Masseter	LC1sb	Biral et al. (1982)
Embrionic	LC1emb	Whalen et al. (1978)
Cardiac muscle		
Ventricular	LC1v & LC2v	Dalla Libera (1988)
Atrial	LC1a & LC2a	Arnold et al. (1988)
Smooth / non-muscle	LC1g & LC2g	Burridge (1974)

れること、またカルシウムの調節に役割を担っていることなどから、P-LCやR(regulatory)-LCと呼ばれることもある。ミオシン1分子は必ず2分子のalkali LCと2分子のDTNB LCを含んでいる(図2)。

LC1fとLC3fの構造を比較すると、C末端側の141個のアミノ酸配列は同様であるが、LC1fにおけるN末端側46個とLC3fにおける8個の配列に違いがみられる(図3; Frank & Weed, 1974)。また、鳥類と哺乳類とではLC1fのアミノ酸が部分的に異なるのは当然であるが、鳥類と哺乳類のLC1fにおいてみられるアミノ酸の入れ代わりが同様にLC3fにも観察されることが報告されている(Matsuda et al., 1981)。これらは、この2つのタンパクが同一の遺伝子からコードされ、スプライシングの過程において異なるmRNAが作られていることを示唆するものであり、これを裏付ける報告がなされている(Robert et al., 1982; Periasamy et al., 1983; Nabeshima et al., 1984)。

発育の過程において、速筋ではLC1fの発現はLC3fに先行して始まり(Sreter et al., 1975; Gauthier et al., 1982)、この現象はそれぞれのmRNAでも同様であることから、少なくともこの段階におけるfast alkali LCは発現は転写レベルによって制御されていると考えられる。一方、ヒラメ筋に代表される遅筋では、LC3fをコードするmRNAは蓄積しているがそれに相当する量のタンパクは発現しておらず(Barton et al., 1985)、転写後に何らかの制御機構が存在することが示唆される。速筋において収縮活動量が増加するとLC3fの減少が起こるが(Bar et al., 1989; Kirschbaum et al., 1989a; Kirschbaum et al., 1989b)、LC3fのタンパクレベルでの減少量は、

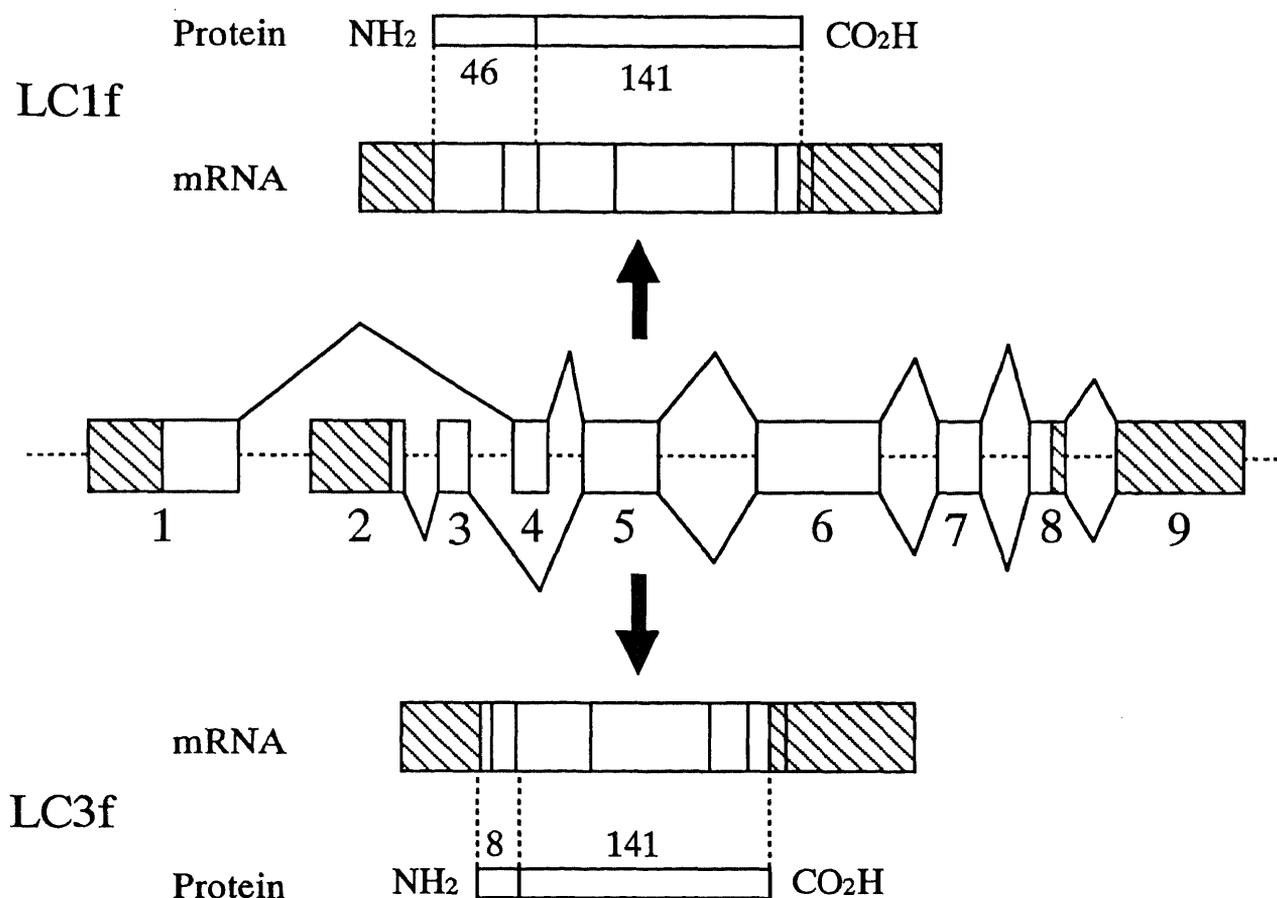


Fig. 3. Schematic illustration of the mouse gene encoding the two myosin alkali light chains of fast skeletal muscle. Exon sequences are numbered 1-9 where 1 and 4 are specific to LC1f and 2 and 3 to LC3f. Hatched boxes correspond to non-coding regions in the mRNAs. The number of amino residues for the common and specific regions of the LC1f and LC3f protein is indicated. (From Barton & Buckingham, 1985)

mRNAの減少量(Kirschbaum et al., 1989a, b)あるいはLC3fのメチオニンの取り込み量の減少を上回る(Bar, et al., 1989)ことが報告されており、これらは遅筋において推察されているLC3fの制御機構が場合によっては速筋においても作用することを示すものである。

LC1saとLC1sbの相対的な発現量は種によって、また同一の個体であっても筋によって大きく異なり(Carraro et al. 1981; Pinter et al. 1981; Biral et al., 1982; Mabuchi et al., 1984)、例えばラビットのヒラメ筋ではラットと比べLC1saを多く含み、LC1sa/LC1sbの比は約10倍高い (Termin & Pette, 1993)。ここまで成熟した個体の骨格筋に発現している代表的なLCについて述べてきたが、これら以外に胎児期にのみ特有に発現するもの、心房、心室、咬筋、平滑筋などの特定の筋や非筋細胞に特異的にみられるものなど多くのアイソフォームが存在する (表 2; Burrige, 1974; Kelly, 1980; Biral et al., 1982; Whalen et al., 1982; Strohmman et al., 1983)。なお、ペプチドマップによる分析あるいはドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) における移動度の比較から、LC1aとLC1sb (Whalen & Sell, 1980; Cummins 1982)、LC1vとLC1sbおよびLC2vとLC2s (Weeds, 1976; Dalla Libera, 1988)は同一のものであると考えられている。

b-3 ミオシン重鎖

ミオシンとキモトリプシンを反応させるとマグネシウムイオンやカルシウムイオンなど2価のカチオンイオンが存在する場合は、胴体の中央部分

で2つに解離し、尾部はライトメロミオシン (LMM) と頭部はヘビーメロミオシン (HMM) と呼ばれる (図2; Weed & Pope, 1977)。HMMはパパインによってさらにS-1とS-2に2分される。S-2とLMMを併せてロッド (rod) と、一方S-1をヘッド (head) という。S-1にHCのN末端があり、ヘッドはHCの全アミノ酸約半分 (分子量96Kダルトン) から構成されている。ロッドは α -ヘリックス (α -helix) を形成しており、2本のHCはさらにゆるやかに螺旋状に絡まった構造 (coiled-coil構造) をとっている。

HCには幾つかのアイソフォームが存在するが、発現しているそれぞれのアイソフォームの割合は、筋の種類によっても異なるし (Bar & Pette, 1988; Aigner et al., 1993; Talmadge & Roy, 1993)、同一の筋であっても収縮活動量の変化のみならず (Termin & Pette, 1992; Kirschbaum et al., 1990 ; Termin et al., 1989a)、発育・老化 (Larsson et al, 1993; Sugiura et al., 1992a; Klitgaard et al, 1990) あるいはホルモンの分泌状態 (Fitzsimons et al., 1990b; Tsika et al., 1987b) などに応じて変化することが知られている。

遅筋に存在するslow typeと速筋に存在するfast typeの2種類のアイソフォームがあることは早くから確認されていたが (Locker & Haayard, 1967; Rushbrook & Stracher, 1979; Carraro & Catani, 1983)、fast typeにおけるサブタイプを明確に分析できるようになったのは比較的最近である。1986年にDaniel-Bette et al. (1986) が、翌1987年にStaron & Pette (1987b) が、SDS-PAGEによって、初めてfast type HCを2種類のサブタイプ(HCIIA、HCIIB)に分離することに成功し、これらが組織化学的に同

定される type IIA 線維と type IIB/D 線維に特異的に発現していることも合わせて証明した。

さらに、Schiaffino et al. (1985, 1986, 1989) は免疫組織化学的手法から、fast type HCに第3のアイソフォームが存在することを報告し、Bar & Pette (1988) はこのアイソフォームをSDS-PAGEによって検出することが可能なことを示した。Schiaffino et al. (1985, 1986, 1989) はこのアイソフォームをHCIIXと、一方Bar & Pette(1988)はそれが横隔膜 (Diaphragm) に多く発現していたことからHCIIDと命名した。本論文ではではBar & Pette (1988) のネーミングを用いることにする。Schiaffino et al. (1985, 1986, 1989) あるいはBar & Pette (1988) の報告以前にHCIIDが検出されなかったのは、免疫組織化学的には、type IIB/D 線維とtype IID 線維の酸あるいはアルカリに対するmATPase活性の増減の類似性 (Termin et al., 1989b; Gorsa, 1990; Lind & Kernell, 1991; Hamalainen & Pette, 1993) から類推されるように、HCIIBとHCIIDのエピトープが極めて似かよった構造をしているであろうこと、また電気泳動的には、分子量が約200Kダルトンと大きな構造物であるにもかかわらず、HCIIAとHCIIDとの分子量の差異が相対的に小さいため、限定された条件下でのSDS-PAGEでしか両者を分離できないこと (Bar & Pette, 1988; LaFramboise et al., 1990; Sugiura & Murakami, 1990; Talmadge & Roy, 1993)などに起因するものと思われる。

Sawchak et al. (1992) は、SDS-PAGEにおいてHCIIBとして同定されるバンドに抗体に対する反応性の異なる2種類のものがあることを報告して

おり、これはfast type HCにおいてさらに未知のアイソフォームが存在することを示唆するものである(表3)。しかしながら、この未知のHCが現実存在するとしても、彼ら (Sawchak et al., 1992) が指摘するように、HCIIBとこの未知のアイソフォームの構造的な差異がロッドのみにとどまるのであれば、このHCの機能的特性は、HCIIBのものと大きくは変わらない可能性が高い。

さらに、これ以外にも眼輪筋 (extraocular muscle) の緊張性 (tonic) 線維においてのみ特異的にみられるアイソフォーム (HCton; Pierobon-Bormioli et al., 1979)、同じく眼輪筋のFT線維においてのみ存在するもの (HCeom; Asmussen et al., 1993)、あるいは胎生期や幼若期において一時的に発現するもの (HCemb、HCneo; Bar & Pette, 1988) など多くの種類のアイソフォームがある (表3)。心筋にはHC α cardとHC β cardの2種類のアイソフォームがみられるが (Lompre et al., 1984)、HC β cardとHCIとは構造的に同様のものであると考えられている (Jandreski et al., 1987)。

HCは多重遺伝子族 (Multigene family) からコードされ (Mahdavi et al., 1986)、HC α cardおよびHCI/ β cardの遺伝子は第14染色体上に (Gulick et al., 1991)、他のアイソフォームの遺伝子はヒトにおいては第17染色体上に、マウスでは第11染色体上に分布していることが明らかになっている (Leinwand et al., 1983)。fast type HCに関して、HCIIAおよびHCIIBはそれぞれ特異的な遺伝子からコードされることが既に認められている (Mahdavi et al., 1987)。HCIIDについては、HCIIAやHCIIBとは別個の遺伝子からコードされるのか、あるいはスプライシングなど転写後の調節作

Table 3. Various myosin heavy chain (HC) isoforms in mammalian muscles. HC β expressed in cardiac muscle is thought to be identical with HC I present in skeletal muscle. HClIB², which was found by Sawchak et al. (1988) but not designated in their study, is an antigenically distinct isoform from HClIB. HCton is expressed in special slow tonic muscle such as extraocular muscle.

Source	Nomenclature	References
Skeletal muscle		
Fast-twitch	HClIA	Danieli-Betto et al (1986)
	HClIB	Danieli-Betto et al (1986)
	HClID	Bar & Pette (1988)
	HClIB ²	Sawchak et al. (1992)
Extraocular	HClom	Asmussen et al. (1993)
Slow-twitch	HClI	Carraro & Catani (1983)
Extraocular	HClton	Pierobon-Bormioli (1979)
Embryonic	HClomb	Bar & Pette (1988)
Neonatal	HClneo	Bar & Pette (1988)
Cardiac muscle	HCl α card	Lompre et al. (1984)
	HCl β card	Lompre et al. (1984)

用によってつくられるのか近年まで明確でなかったが、DeNardi et al. (1993) によって特異的な遺伝子の存在が示唆されている。

ミオシンと同様に β グロビンにも幾つかのアイソフォームがあり、それらの遺伝子群は第11染色体上に存在している。そして、それぞれの遺伝子は、発生の際に出現する順序に対応して5'から3'の方向にならんで位置しており、このことは遺伝子の配列順序が転写の時相的制御にある程度影響を及ぼすことを示唆する。HCについてはどうであろうか。ヒトのHCの遺伝子配列について検討したYoon et al. (1992)の結果は、胎生期に発現するHCの遺伝子とそれに引き続き分娩時に発現するHCの遺伝子とは隣り合っ て配列していないことを示しており、少なくともヒトにおいては遺伝子の配列順序と転写の順序とは相関があるとは結論されない。

b-4 アイソミオシン

SDS-PAGEでは、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) がタンパクに対して強い変性剤として作用するため、ミオシンはHCとLCとに分かれてゲル中を挙動する。したがって、SDS-PAGEから得られるデータからは、HCあるいはLCそれぞれの定量的・定性的特徴を知ることはできるが、生体内でミオシン分子がどのような状態で機能しているのかについては、的確にとらえることはできない。

イオン強度の低い溶液中ではミオシンはフィラメントを形成してしまうため、電気泳動により非変性条件下、すなわちHCとLCが結合したままの状態ですら分離することには困難が伴った。しかしながら、ATPやATPのア

ナログを含んでいればイオン強度が低い溶液中であってもミオシンはフィラメントを形成しないことが明らかになり (Brahms & Brezner, 1961)、非変性状態でミオシンをアイソフォームに分画することが可能になった (Hoh, 1975)。ATPのアナログの1つであるピロリン酸ナトリウムを用いたピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PPi-PAGE) は、ミオシンを非変性条件下でアイソフォームに分離する方法の中で最も頻繁に使われてきた方法であり、Hoh et al. (1976, 1979) や d'Albis et al. (1973, 1979) によって開発・改良されてきた。非変性条件下で分離されたミオシンのアイソフォームは通常「アイソミオシン」と呼ばれる。

非変性条件下での電気泳動が開発されてまず得られた知見は、slow type (SM) と fast type (FM) の2種類のアイソミオシンが存在し (Hoh, 1975)、FMにはさらに3種類に分画されることである (Hoh et al., 1976)。この3種類のFMはゲル上における移動速度の速い順にFM1、FM2、FM3と呼ばれる (d'Albis & Gratzner, 1973; Hoh & Yeoh, 1979)。FMに含まれるLCのアイソフォームについてはかなり明確になっており、FM1は(LC3f)₂ (LC2f)₂から、FM2は(LC1f)(LC3f)(LC2f)₂から、またFM3は(LC1f)₂ (LC2f)₂から構成されている (d'Albis et al., 1978; Hoh & Yeoh, 1979; Fitzsimons & Hoh, 1981; Fitzsimons & Hoh, 1983; Tsika et al., 1987)。また、ゲル上においてFMとSMとの間に分画されるバンドが観察されることも報告されており (Fitzsimons & Hoh, 1983; d'Albis et al., 1986; Tsika et al., 1987)、このアイソミオシンはインターメディアイトミオシン (IM) と命名された。IMを構成するLCのアイソフォームについて

は必ずしも明確ではないが、遅筋から検出されるIMは(LC1f)(LC1s)(LC2f)₂を、それに対して速筋から検出されるIMは(LC1f)₂(LC2f)₂を含んでいると考えられている (Fitzsimons & Hoh, 1983; d'Albis et al., 1986; Tsika et al., 1987b)。

SMに移動速度の異なる2種類のアイソミオシンがあることは、Pinter et al. (1981)によってはラットの筋において、Fitzsimons & Hoh (1981)によってはヒトの筋において最初に報告され、これらはFMと同様に移動速度の速い順にSM1およびSM2と呼ばれた。SMのアイソミオシンを構成するalkali LCは種によって異なり、ヒトおよびラットではSM1はLC1sa、SM2はLC1sbを (Fitzsimons & Hoh, 1981; Termin & Pette, 1991)、これとは逆にラビットではSM1はLC1sb、SM2はLC1saを含んでいると考えられている (Pinter et al., 1981)。またSM1、SM2以外には、SM1よりさらに移動速度の速いアイソミオシン (SM'1) が認められることが報告されている (Marechal et al., 1984; Gregory et al., 1986)。

既に述べたように、成熟した齧歯類では多くの骨格筋においてHCについては4種類のアイソフォーム(HCI、HCIIA、HCIID、HCIIB)が、LCについても4種類のalkali LCのアイソフォーム (LC1sa、LC1sb、LC1f、LC3f) が発現している(表2、3)。ミオシン1分子に含まれる2つのHCが異なる可能性、あるいはslow type LCとfast type LCがミオシン1分子中に混在している可能性を否定したとしても、これらHCおよびLCのアイソフォームの組み合わせからは、理論的には12種類のアイソミオシンが存在することになる。これまで最大で7種類のアイソミオシン (SM1、SM'1、

SM2、IM、FM1、FM2、FM3) しか観察されてこなかったのは、用いられたPPi-PAGEの解析能が十分でなかったためか、あるいはHCとLCの各アイソフォーム間に特異的な親和性があり、理論的に考えられるような多種のアイソミオシンが実際に存在していないためかのどちらかであろう。

Termin & Pette (1990, 1991)はPPi-PAGEに改良を加えこの問題について検討し、PPi-PAGEにおけるアイソミオシンの移動速度は含まれるLCのみならずHCによっても影響を受け、理論的に推測された12種類のアイソミオシンが検出されたことを報告している (図4)。そして、これまで用いられてきたFM1-3という名称は、その数字からそれぞれのアイソミオシンを構成するalkali LCの違いは示すことはできるがHCについては表記することができないので、それが可能なようにFM1-3a、FM1-3b、FM1-3dという呼称を用いることを提唱している (表4)。これら12種類のアイソミオシンに含まれるLCおよびHCのアイソフォームについては、Hoh & Yeoh (1978) が最初に行ったようにPPi-PAGEとSDS-PAGEを組み合わせで直接検討されたわけではないが、全筋におけるアイソミオシン、HCおよびLCの定量的データの比較から表4に示すようであると考えられている (Termin & Pette, 1991)。なお、従来示されてきたアイソミオシンとTermin & Petteが分画したのものとは、各アイソフォームのゲル上の移動速度と量的な特性から考え、IM-FM3a、SM'1-SM1、SM1-SM2およびSM2-SM3とがそれぞれ対応するものと推測される。さらに、胎生期や幼若期に一過性に発現するアイソミオシンも存在し、胎生期にみられるものに4種類(eM1-4)、幼若期のものに3種類(nM1-3)があるとされている

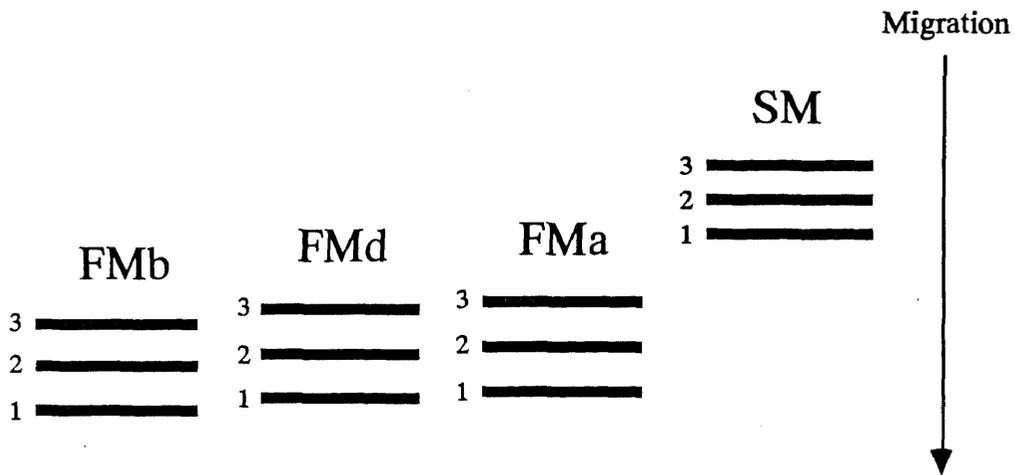


Fig. 4. Schematic illustration of the electrophoretic mobilities of isomyosin triplets in adult rat skeletal muscle. Abbreviations: *SM*, HClI-based slow isomyosin; *FMa*, HClIA-based fast isomyosin; *FMd*, HClID-based isomyosin; *FMb*, HClIB-based isomyosin. Arrow indicates direction of migration. (From Termin & Pette, 1991)

Table 4. Rat skeletal muscle isomyosins and their subunit composition. Data are derived from studies of Termin & Pette (1991) and Hoh & Yeoh (1979). The light chain complement of the embryonic isomyosins remains obscure although it is suggested to represent various combinations of fast light chain 1 and embryonic light chain 1.

Source	Isomyosin	Heavy chain	Light chain
Slow-twitch muscle	SM3	HCI	(LC1sb) ₂ (LC2s) ₂
	SM2	HCI	(LC1sa) (LC1sb) (LC2s) ₂
	SM1	HCI	(LC1sa) ₂ (LC2s) ₂
Fast-twitch muscle	FM3a	HCIIA	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂
	FM2a	HCIIA	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂
	FM1a	HCIIA	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂
	FM3b	HCIIIB	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂
	FM2b	HCIIIB	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂
	FM1b	HCIIIB	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂
	FM3d	HCIID	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂
	FM2d	HCIID	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂
	FM1d	HCIID	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂
Neonatal muscle	nM3	HCneo	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂
	nM2	HCneo	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂
	nM1	HCneo	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂
Embryonic muscle	eM4	HCemb	?
	eM3	HCemb	?
	eM2	HCemb	?
	eM1	HCemb	?

(Termin & Pette, 1991)。

C 組織化学的に分類される筋線維タイプとミオシンとの関係

mATPaseの活性部位はLC上にはないこと (Wagner & Giniger, 1981)、あるいは同タイプの単一筋線維に存在するHCはすべて同一であること (Staron & Pette, 1986, 1987a, b) などから、mATPase活性に基づき分類される筋線維タイプは、ミオシンフィラメントを構成しているHCのアイソフォームの種類によって決定されることが広く認められている。このことはtype I 線維にはHCIが、type IIA 線維にはHCIIAが、type IIB 線維にはHCIIBが、またtype IID 線維にはHCIIDが特異的に発現していることを意味する(表5)。正常な筋ではわずかに観察される (<1%) type IIC 線維は (Jansson et al., 1978; Staron et al., 1987a, b; Staron, 1991)、特有のHCを発現している筋線維ではなく、HCIとHCIIAの2種類のアイソフォームを含むものである (Pette & Staron, 1986; Aigner et al., 1993)。このことから、これらはtype IIA 線維とtype I 線維間において移行過程にある筋線維だと考えられている。同様にtype IIAD 線維やtype IIDB 線維からも2種類のHCのアイソフォームが検出され(表5; Termin et al., 1989a; Aigner et al., 1993)、前者はtype IIA 線維とtype IID線維間で、後者はtype IID 線維とtype IIB 線維間で移行が進行している筋線維であるとみなされている。

多くのtype I 線維はslow type LC (LCs) のみを、またtype II 線維はfast type LC (LCf) のみを発現しているが(表5)、type I 線維とtype II 線維の移行過程にあるtype IIC 線維以外にも、数のうえではあまり多くはないが

Table 5. Myosin light chain (LC) and heavy chain (HC) isoforms in histochemically typed fiber from rodent skeletal muscle. Data are derived from studies of Staron & Pette (1987 a, b), Staron et al. (1987), Termin et al. (1989b), and Aigner et al. (1993). The parentheses mean that a few fibers express light chain or heavy chain isoform shown in the parenthesis.

	Fiber type						
	I	IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
Heavy chain	HCI	HCI HCIIA	HCIIA	HCIIA HCIID	HCIID	HCIID HCIIIB	HCIIIB
Light chain	LC1s	LCs	LC1f	LC1f	LC1f	LC1f	LC1f
	LC2s	LCf	LC2f	LC2f	LC2f	LC2f	LC2f
	(LCf)		LC3f	LC3f	LC3f	LC3f	LC3f
			(LCs)				

LCsとLCfの両方を発現している（混在型）筋線維がみられる。Staron & Pette (1987a, b) による単一筋線維についての組織化学的・電気泳動学的分析は、ラビット前脛骨筋では混在型type IIA 線維はなかったが、ヒラメ筋では存在していたことを示している。また、ヒラメ筋における混在型type IIA 線維は、ラットにおいてもみられること (Sugiura et al., 1992b)、あるいはtype IIA 線維から移行してきたと思われるtype I線維は、LCsに加えLC1fを発現していることなども報告されている (Staron et al., 1987)。一方、ヒト骨格筋に関する報告では、Billeter et al. (1981) によってはtype IIA 線維には混在型はないが、type I 線維には存在することが、それに対してLarsson & Moss (1993) によってはtype I、IIA、IIB 線維のいずれも約50%が混在型であることが認められている。このような知見の相違が、種による差異なのか、筋による差異なのか、あるいは他に原因があるのかについては明らかではない。また、筋線維にみられるHCあるいはLCのslow typeとfast typeの混在が分子レベルではどのように構築されているのか、すなわち1サルコメア内において両アイソフォームが混在しているのか、1サルコメア内は均一のアイソフォームで構成されているがサルコメア毎に違うのか、あるいは筋原線維毎に違うのかについても明確ではない。

type I 線維におけるalkali LC (LC1sa、LC1sb) の定量的な分布についてはよく分かっていない。type II 線維についても、単一筋線維を対象とした定量的研究がこれまでなされていないので必ずしも明確ではないが、type IIA 線維を多く含む筋ではtype II B/D 線維を多く含む筋と比べ、LC3fに

対するLC1fの比 (LC1f/LC3f) が高いことが認められており(Mabuchi et al., 1982; Termin & Pette, 1990)、type IIA 線維は他のtype II 線維と比べLC1fを多く発現していることが推察される。

2. 筋線維の収縮特性に關与する要因

A ミオシン

Bárány (1967) は数種類の動物の筋におけるactin-activated ATPaseを測定し、筋の最大収縮速度 (V_{max}) を大きく規定するのはミオシンによるATPの加水分解の速度であることを示した。これはmATPaseの活性部位がHC上にあることとあわせ (Wagner, 1981; Lowey et al., 1993)、mATPase活性に基づいて分類される筋線維はタイプ毎で、言い替えれば発現しているHCのアイソフォームの種類によって、筋線維の V_{max} が異なることを示唆する知見である。このことは、単一筋線維を対象とした研究によってさらに明確にされてきた (Reiser et al., 1985; Reiser et al., 1988; Sweeney et al., 1988; Moss, 1990; Bottinelli et al., 1991; Bottinelli et al., 1993; Larsson)。例えば、Reiser et al. (1985) によるラビットのヒラメ筋における単一筋線維の V_{max} についての検討は、type IIA 線維の V_{max} はtype I 線維と比べ約2～3倍速いこと、ならびにfast HCとslow HCが混在している筋線維では含まれる fast HC の割合が高いほど V_{max} が速いことを示している。このtype I 線維とtype IIA 線維間の V_{max} の差異は、遅筋と速筋間

のmATPase活性の差異にはほぼ匹敵する (Baldwin et al., 1982; Saltin & Gollnick, 1983)。また、fast HCとslow HCが混在する筋線維においてVmaxがサイクル速度の速いクロスブリッジに依存しないのは、サイクル速度が遅いクロスブリッジが収縮の際、内部で抵抗として作用していることを示唆する。

近年、type II 線維のサブタイプのVmaxについて幾つかの報告がなされている。それらによるとVmaxは、type IIB > type IID > type IIAの順で速いが (Bottinelli et al., 1991)、それぞれの線維内におけるレンジは実験の誤差範囲を大きく超え、結果的にVmaxは線維間でかなりの部分オーバーラップしているという。前述のようにVmaxがHCのみによって規定されると仮定すると、このような現象は起こりえないはずであり、HC以外の何かはVmaxに影響していると思われる。この問題について統一した見解が得られているわけではないが、alkali LC の存在がクローズアップされている。Bottinelli et al. (1993) はVmaxとLC3fの含有量の間には正の相関関係があることを、また、Moss (1990) はLC3fをミオシン分子に結合するとVmaxが増加し、逆にLC1fを結合すると減少することを報告している。Lowey et al. (1993)の研究はさらに興味深く、alkali LCを含まないミオシン上でのアクチンの移動速度は、alkali LCを含むミオシン上でのものの約1/3であることを示しており、これらはいずれもalkali LCはATPの加水分解には関与しないとしても (Lowey et al., 1993)、クロスブリッジサイクルにおける化学的エネルギーを機械的エネルギーに変換する過程で、アクチンと何らかのかたちで作用し、Vmaxに影響を及ぼしていることを示唆

するものである。このように幾つかの先行研究が示すように、HCとLCの2つがVmaxに関与しているのであれば、このことは筋線維がVmaxを変化させなければならない必然性におかれた場合、より詳細なステップでそれを成就することにつながり、生理的に多様な需要に対する対応を可能にすることになる。

DTNB LCはmATPase活性の最大値はもとより(Perick, 1980; Persechini & Stull, 1984)、Vmaxにも影響を及ぼすことはないが (Barsotti & Butler, 1984; Sweeney & Stull, 1986)、他の特性の変化に寄与するとされている。これらが磷酸化されるとmATPase活性のKmの減少や (Perick, 1980; Persechini & Stull, 1984)、等尺性収縮における増強作用 (isometric potentiation) の程度が強まるなどの変化が起きる (Moore & Stull, 1984; Moore et al., 1985)。このような現象は磷酸化によって筋原線維のフィラメントのカルシウムに対する感受性が増すことに原因があるとされている。

平滑筋においては、LCの磷酸化が果たす役割は骨格筋よりも明確になっている。LCが磷酸化されると、次の2つの変化がおこる。1つはミオシン頭部のコンフォメーションが変化しアクチンとの結合部が露出することであり、もう1つは磷酸化前はLMMがHMMの粘着部位と結合していたものが解放され、ミオシンフィラメントを形成するようになることである。平滑筋における収縮の制御はミオシン軽鎖キナーゼを通して行われることが多い。例えば、アドレナリンはミオシン軽鎖キナーゼの磷酸化を介し、DTNB LCの磷酸化を阻害することによって筋を弛緩に導くことが認められている。

単位面積当たりの最大等尺性張力に関しては、単一筋線維レベルの研究からtype I 線維がtype II 線維と比べ小さいことは認められているが (Eddinger & Moss, 1987; Bottinelli et al., 1991)、type II 線維間ではtype IIB/D 線維がtype IIA 線維より大きいとする報告もあれば (Eddinger & Moss, 1987; Greaser et al., 1988)、差異はないとする報告もあり明らかではない (Bottinelli et al., 1991)。type I 線維とtype II 線維の違いが、アイソミオシンの化学的・機械的特性の差異に大きく招来されているのか、あるいは単に筋線維に占める筋原線維の相対量の差異によるだけのものなのかは、明確に結論づけられてはいない。

B その他の要因

筋内のカルシウムの濃度 ($[Ca^{2+}]$) は、様々な側面において重要な役割を担っている。ピルビン酸脱水素酵素 (Denton et al., 1972)、プロテアーゼ (MacGrath & Goldspink, 1980) あるいは筋内へのグルコースの輸送 (Youn et al., 1991) などに対して調節因子として作用しているのに加え、細胞内 $[Ca^{2+}]$ が $10^{-6}M$ を超えて初めて収縮が開始されることで知られるように、筋収縮を直接制御するため、 $[Ca^{2+}]$ を調節する機構は収縮特性に大きな影響を及ぼす。

$[Ca^{2+}]$ は筋原線維を取り囲むように発達している筋小胞体 (SR) によって調節され、必要に応じて放出・回収される。SRによる Ca^{2+} の取り込みは能動輸送によって行われ、SRの膜上にある分子量105000ダルトンの Ca^{2+} -ATPase がそのエネルギーを供給する。ATP 1 mol が加水分解されると

2 molのCa²⁺が取り込まれることが知られている (Inesi, 1973)。速筋に発現しているSRと遅筋に発現しているSRは異なる遺伝子からコードされ、これらの塩基配列には約15%の違いがある (Brandl et al., 1987)。この構造的な違いは機能的な差異に反映され、速筋におけるCa²⁺-ATPase活性は遅筋におけるものより6～7倍高いことが示されている (Pette & Staron, 1990)。

約2.8分の膝伸展運動によってCa²⁺-ATPase活性が42%低下したとする Gollnick et al. (1991)の報告、あるいは約2時間の長時間ランニングによって同酵素活性値が30%減少したことを示す Luckin et al. (1991)の報告などから明らかのように、Ca²⁺-ATPase活性は運動の継続時間とは無関係に、疲労困憊に至る一過性の運動に起因して顕著に減少する。この極めて迅速な活性値の低下の原因としては、細胞温度の上昇によるSR脂質膜の変化 (Inesi et al., 1973)、ATPの濃度の低下 (Edwards et al., 1975)、あるいはpHの低下 (Donaldson & Hermansen, 1978) などが考えられるが、近年これらよりも主としてSRのATPバイディング部位が化学的な修飾を受けることによるとする知見が支持されている (Scherer & Deamer, 1986; Luckin et al., 1991)。Ca²⁺-ATPaseの低下は単収縮における収縮速度には直接影響することはないが、弛緩速度を遅延させるため (Gollnick et al., 1991)、繰り返し行われる収縮では単位時間内における反復回数を減少させることにつながる。

SR以外の細胞内[Ca²⁺]調節因子としては、パルブアルブミン(PA)が挙げられ、このタンパクは筋が弛緩する際、トロポニンからSRへCa²⁺を運ぶシャ

トルとして作用していると考えられている (Gerday & Gillis, 1978)。Ca²⁺に対する親和性は、トロポニンC < PA < SRの順で高い(Potter et al., 1978)。そのため、SRの働きによって[Ca²⁺]が低下すると、PAはトロポニンCからCa²⁺を受け取りPA-Ca²⁺複合体を形成する。さらにPA-Ca²⁺複合体が拡散によってSRのCa²⁺バインディング部位に到達すると、SRはPAからCa²⁺を受け取ることになる。PAとSRが共存する時のトロポニンからのCa²⁺の除去速度はSRだけの場合と比べ速く、SRに加えPAも弛緩速度の規定因子として機能していることは十分考えられる。特に細胞内の温度が低く保たれる動物では、SRのCa²⁺ポンピング作用は十分に機能せず、PAの重要性は大きいと思われる。事実、収縮・弛緩速度が極めて速い魚類骨格筋におけるPAの含有量は、哺乳類より高いことがBaron et al. (1975)やHarmoir et al. (1980)によって報告されている。

SRが十分機能する環境下では、Ca²⁺の回収に果たすPAの影響は魚類におけるものほど大きくはないであろうが、哺乳類の骨格筋においてもPAの含有量が高ければ高いほど弛緩速度が速いことが認められている(Berchtold et al., 1982)。PAの分布を筋線維タイプ別にみると、平均値ではtype IIB > type IID > type IIA > type Iの順で大きいことが示されている(Celio & Heizmann, 1982; Fuchtbauer et al., 1991; Schmitt & Pette, 1991)。type IIB 線維とtype IID 線維における含有量は類似しているが、これらと比べるとtype IIA 線維およびtype I線維の含有量は少なく、ラビット骨格筋ではtype IID 線維の1/20~1/50程度である。また、同一のタイプであっても差異があり、例えばラビット前脛骨筋のtype IID 線維では含有

量の最も高いものと最も低いものとは10倍もの開きがある (Schmitt & Pette, 1991)。

3. 筋線維と運動パフォーマンス

A. 筋線維組成と運動能力

a-1 持久能力との関係

前述のように、type I 線維とtype II 線維とでは種々の特性に著しい違いが存在するために、筋を構成するそれぞれの線維の分布比率、すなわち筋線維組成によって、その筋の機能が大きく限定され、ひいては全身的な運動パフォーマンスにも影響を及ぼす。競技スポーツにおいて優れた結果を残すために、筋線維組成が重要であるとされるのはそのためである。

Bergh et al. (1978) は多数の競技者および非競技者について脚筋に占めるtype I 線維の割合 (%type I 線維) と全身持久能力の指標である最大酸素摂取量の関係について検討し、両者の間に正の相関関係があることを示した(図5-a)。無氣的作業閾値との関係においても、最大酸素摂取量同様、%type I 線維との間に正の相関がみられるが、筋線維組成は最大酸素摂取量よりもむしろ無氣的作業閾値と密接な関係にある(相関係数が高い)ことが示されている(図5-b)。最大酸素摂取量を決定する要因には、筋を中心とした末梢系の機能だけではなく、呼吸循環器系などの中枢系の機能も大きく関与する。これに対して無氣的作業閾値では、筋におけるエネルギー

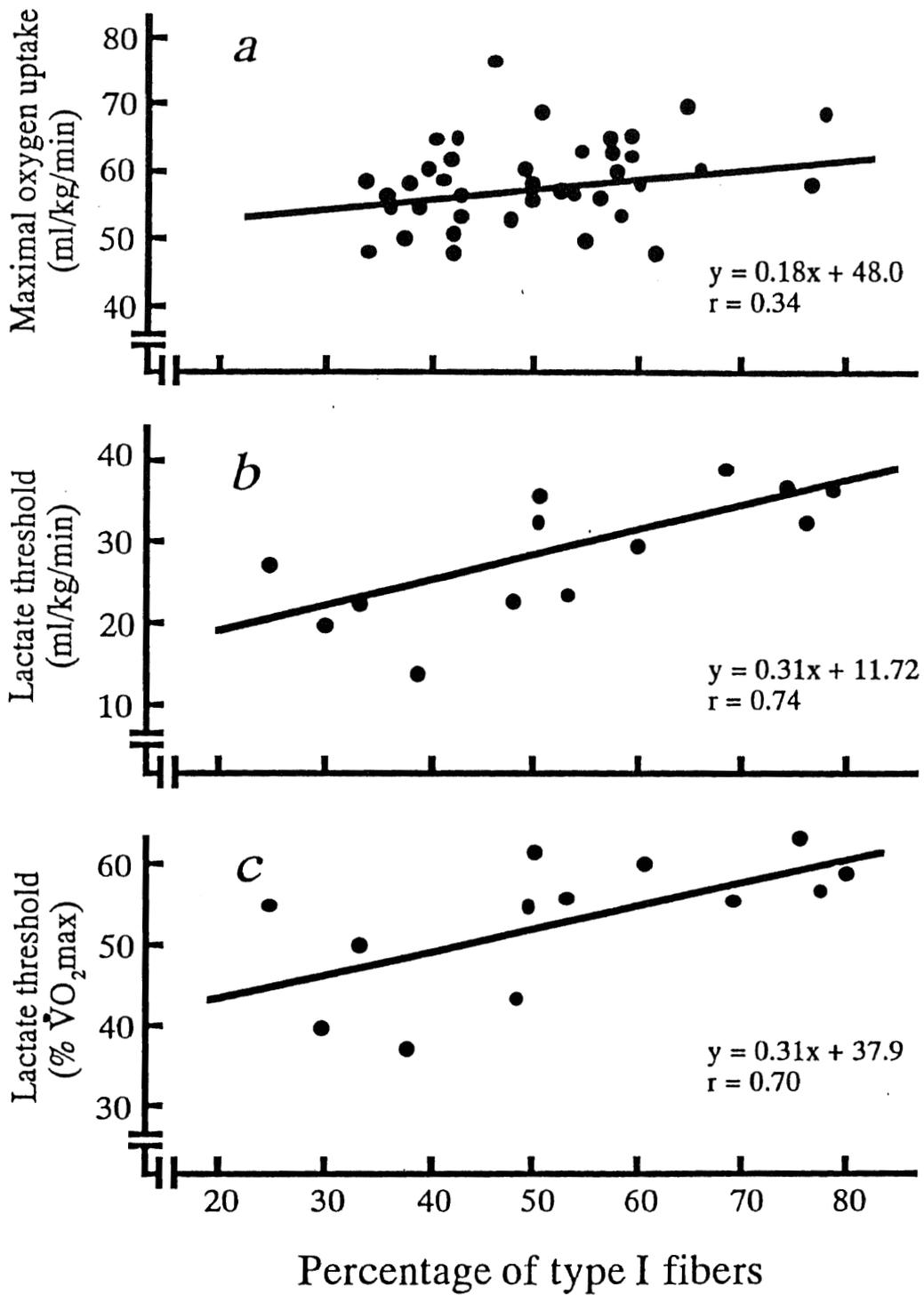


Fig. 5. Maximal oxygen uptake and lactate threshold in relation to muscle fiber composition in human skeletal muscle. (From Bergh et al, 1978 and Ivy et al., 1980)

源としての脂質の利用率が特に問題となり、type II 線維と比べtype I 線維に

においてその利用率が高い。これに加え、ピルビン酸から乳酸への反応を触媒するLDHは、type I 線維においてその活性値がtype II 線維より低いだけでなく、ピルビン酸に対するKmが高いアイソザイムが多く存在するため (Pette, 1986)、乳酸の発生が低いレベルに抑えられることが知られている。このように無氣的作業閾値では、最大酸素摂取量と比較すると筋の特性に依存する部分が大きく、これが%type I 線維と無氣的作業閾値とが高い相関関係にある原因である。

無氣的作業閾値と筋線維組成との関係をさらに詳しくみると、無氣的作業閾値に相当する運動強度を最大酸素摂取量に対する相対値で表わしても、%type I 線維との間に正の相関関係が成り立つ(図5-c)。したがって、筋に占めるtype I 線維の割合が低い者と高い者とでは、最大酸素摂取量以上に無氣的作業閾値に大きな差異ができることになる。マラソンのレース中のスピード(運動強度)は、ほぼ無氣的作業閾値に匹敵するといわれており、この競技におけるtype I 線維の重要性が強調される。

等尺性収縮において一定の力を発揮し続けることのできる時間と筋線維組成の間に有意な関係があるかどうかについては、%type I 線維と正の相関があるという報告 (宮田ら, 1985) とそのような関係はないという報告 (Maughan et al., 1985) がなされている。この能力を限定する要因が何であるのかについては必ずしも明確になっているわけではなく、このように相反する結果が得られた素因については言及することはできない。

a-2 収縮速度および筋力との関係

type I 線維とtype II 線維とでは発現しているHCのアイソフォームの種類に起因してmATPase活性が異なり、個々の筋線維の収縮速度は後者において3～10倍高いため (Larsson & Moss, 1993)、筋線維組成は筋のVmaxを直接左右することになる。張力とスピードの積であるパワーもまた筋線維組成と深く関連するが、type II 線維が特に重要な役割を果たすことがFaulkner et al. (1986) によって報告されている。それによるとtype I 線維、type II 線維ともにVmaxの約1/3の速度で最大のパワーを示し、type II 線維の値はtype I 線維のおよそ4倍であるという。しかしながら、両タイプが混在する筋束においては、発揮するパワーに対するtype I 線維の寄与は、両線維の個々のパワーから予想されるものよりもはるかに小さいことが認められている。これはDudley et al. (1982) が指摘するように、ある程度の速度を伴った収縮においては、type I 線維はtype II 線維に引きずられるようなかたちで収縮することになり、十分な張力を出すことができなくなるためであると思われる。

一方、最大随意等尺性収縮力は一般に筋線維組成に左右されないといわれている (Hulten et al., 1975)。筋に占める収縮要素の割合がtype I 線維よりtype II 線維において高いことなどに起因して (勝田, 1974)、1本の筋線維が発揮することのできる等尺性張力はtype II 線維の方が大きい (Bottinelli et al., 1991)。したがって、type II 線維を多く含む筋ほど最大随意等尺性収縮力は大きいと考えられるが、前述のようにそのような結果は得られていない。おそらく、随意等尺性収縮力に関しては、収縮要素の割合よりも、筋線維横断面積あるいは運動単位の動員様式や活動時相の同

期化などの要因が大きく影響するからであろう。

a-3 回復力との関係

筋内のpHが低下するとクロスブリッジの形成が妨げられ発揮しうる張力が低減するため (Robertson & Kerrick, 1979)、収縮によって発生した乳酸を短時間で除去することは、運動による疲労からの素早い回復に不可欠である。産生された乳酸はその筋線維内のミトコンドリアで酸化・除去されるか、毛細血管を通じて血液中に流出し肝臓や他の筋で処理される。したがって、ミトコンドリアと毛細血管の発達の度合が疲労の回復に対して重要な要因となる。

Tesch & Wright (1983)は最大努力で連続50回の膝伸展運動後、40秒の休息をおいてさらに同様の運動を5回行わせたところ、休息後の筋力の回復率と外側広筋における毛細血管の密度との間に正の相関関係があることを報告している。1本の筋線維を取り囲む毛細血管の数は、type I > type IIA > type IIB/Dの順で高いが、毛細血管はトレーニングを行えば顕著に増加し、中止すれば減少することが知られている。また、持久的なトレーニングによってミトコンドリアは個々の大きさと数を増し、全体としてはトレーニング前の数倍になることもある。したがって、回復力については、筋線維組成とも関連するがそれ以上に身体的活動レベルに左右される部分が多いとみなすのが妥当かと思われる。

B スポーツ選手の筋線維組成

ヒトの骨格筋は1つのタイプの筋線維のみで構成されているわけではなく、数種類のものが混在している。その比率は同一個体内でも異なるし、また同じ筋でも著しい個体差がみられるものがある。しかしながら、抗重力筋であるヒラメ筋では誰でもがtype I 線維の割合が高く、逆に上腕三頭筋ではtype II 線維の割合が高い傾向にある (Saltin & Gollnick, 1983)。これに対して外側広筋や腓腹筋などは個体差が著しい筋であり、平均ではtype I 線維とtype II 線維の割合はほぼ1:1だが、どちらか一方に片寄った組成を持った者もみられる (Saltin & Gollnick, 1983)。

一流スポーツ競技選手の筋における筋線維組成を、type I 線維とtype II 線維の占める割合でみると、競技種目毎に特徴的な傾向にある(図6)。持久能力を必要とされる種目ではtype I 線維の割合が高く、一方瞬発力を求められる種目ではtype II 線維の割合が高い。この傾向は競技能力が、技術的なものよりも、筋をいかに速くそして長時間収縮させるかといったエネルギー発揮系に大きく依存する種目で特に顕著である。陸上競技のトラック種目はその代表的なものであり、短距離選手ではtype II 線維の割合が70%を超えているのに対して、マラソン選手では逆にtype I 線維の割合が80%を超える。

競泳選手の筋線維組成も同様な傾向にあるが、陸上競技選手とは2つの点において違いがあり、その1つは種目間の差が陸上競技でみられるほど大きくないことである。運動の継続時間がおおよそ類似している陸上競技400m(男子世界記録-43秒29)と競泳100m(男子世界記録-48秒42)、および陸上競技5000m(男子世界記録12分56秒96)と競泳1500m(男子世界記録-14

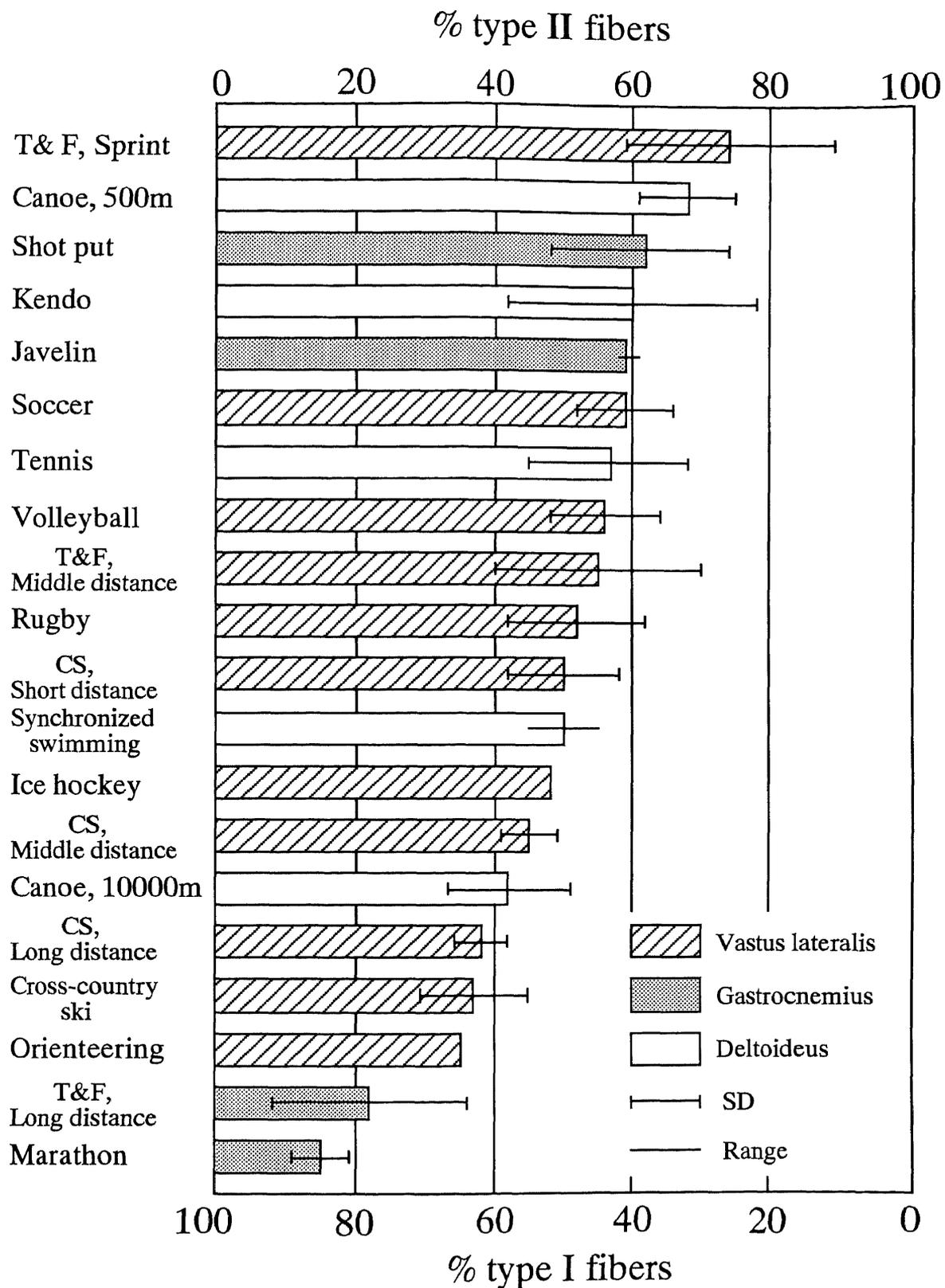


Fig. 6. Muscle fiber composition in skeletal muscle of elite sport players. Abbreviations: T&F, track and field; CS, competitive swimming. (From Katsuta & Wada, 1986 and Wada & Katsuta, 1989)

分41秒66)における平均速度を比較すると、陸上競技では5000mが400mの70.0%であるが、競泳では1500mが100mの82.4%である。このことは、競泳では一人の選手が距離の異なる複数の種目で活躍しやすい傾向にあることとあわせ、種目間での負荷の差がそれほど大きくなく、それが筋線維組成にも反映していると思われる。もう1つの違いは、競泳短距離系選手ではtype I 線維とtype II 線維の割合がほぼ1:1であることに示されるように、全体としてtype I 線維よりにシフトしていることである。これは競泳が水に抗した運動であるため、陸上競技におけるほど速い速度で筋を収縮させる局面は少なく、type II 線維の必要性が低いことに成因があるものと思われる。

球技選手ではtype I 線維かtype II 線維どちらか一方に極端に片寄った組成をもった者は少なく、ほとんどの種目の選手がtype II 線維が50%をやや上回る筋組成である。球技種目では素早い動きを間欠的に繰り返し行うことが要求され、持久力と瞬発力の両者を高いレベルでもつことが必然である。そのため、いずれか一方の筋線維の割合が著しく高いことは、かえってマイナスに作用するのであろう。

type II 線維のサブグループはどのように分布しているのだろうか。特別のトレーニングを行っていないヒトの筋では、type IIA 線維とtype IIB/D線維の比率はおおよそ2:1である。一流スポーツ選手ではどの種目でも例外なくtype IIB/D線維の割合が少なく、特に持久的なトレーニングを行っている陸上・長距離選手や競泳選手では、この線維はほとんどみられないか、あったとしてもごくわずかである。

図6は、スポーツ競技において優れた成績をあげるためには、主働筋の筋線維組成がそのスポーツの運動特性と一致していることが一つの鍵になることを示し、このことはスポーツ適性を占ううえで、筋線維組成が重要な指標になりえることを意味する。しかしながら、注意しなければならないことは、同一の種目内で比較すると筋線維組成の偏差は極めて大きいことである。例えば長距離・マラソン選手は平均値ではtype I 線維の割合が約80%あるいはそれ以上であるが、中には50%ほどしかtype I 線維を持っていないのにもかかわらず、マラソンを2時間11分16秒で走破した選手もいる。したがって、競技スポーツにおいて優れた人材を発掘するうえで、筋線維組成は確かに指標の1つとはなるが、それが全てではなく選手の持つ他の多くの能力を加味して、適性を判断すべきである。

4. 収縮活動量増加に伴う筋線維の変化

A. mATPaseの組織化学的特性により分類される筋線維タイプの変化

筋線維がどのようなタイプとして現出するかは、ただ1つだけの要因によって決定されるわけではなく、幾つもの因子が複雑に絡み合った結果である。しかしながら、その中でも筋線維に負荷される収縮の活動量が大いなる影響力を持つことは広く認められている。収縮活動量の増大が筋線維に及ぼす影響を検討する実験的手法の一つに、骨格筋を支配する神経に電極

を取り付け電気刺激によって人為的に筋を収縮させる方法がある。この方法は運動などとは異なり、(1)活動量を増加させる筋を厳選できること、(2)ターゲットとする筋を構成するほとんど全ての筋線維の活動量を変化させることが可能なこと、(3)片脚を実験側、同一個体のもう一方を対照側とすることによって、筋線維の特性に影響を及ぼすと思われる幾つかの要因の中で、活動量の変化以外のものをかなり排除できることなどの点で優れたモデルである。

図7は、ラビットの長指伸筋を1日12時間電気刺激によって収縮させ続けた時の筋線維組成の変化を示したものである(Pette, 1992)。長指伸筋は典型的な速筋であり、刺激開始前は約60%がtype IIB/D 線維、30%がtype IIA 線維、10%がtype I 線維によって構成されている。刺激開始とともにまずみられる変化は、type IIB/D 線維の減少、type IIA 線維の増加およびtype IIC 線維の出現である。電気刺激をさらに長期間にわたって継続すると、type IIB/D 線維は完全に消失する。それとともに、type I 線維が増加し、この筋線維が最も多くを占めるようになる。

では、type IIB 線維とtype IID 線維間ではどのような変化が起こるのであろうか。電気刺激によるこれらの組織化学的变化について言及した報告はなされていないが、筋線維タイプは含まれるHCのアイソフォームの種類によって決定されるので、HCの変化を観察することによって示唆を得ることができる。Termin et al. (1989a) は、電気刺激を負荷されたラットの長指伸筋においてHCIIBが著しく減少することを認めており、これはtype IIB線維からtype IID 線維へのタイプ移行が生じていることを示すも

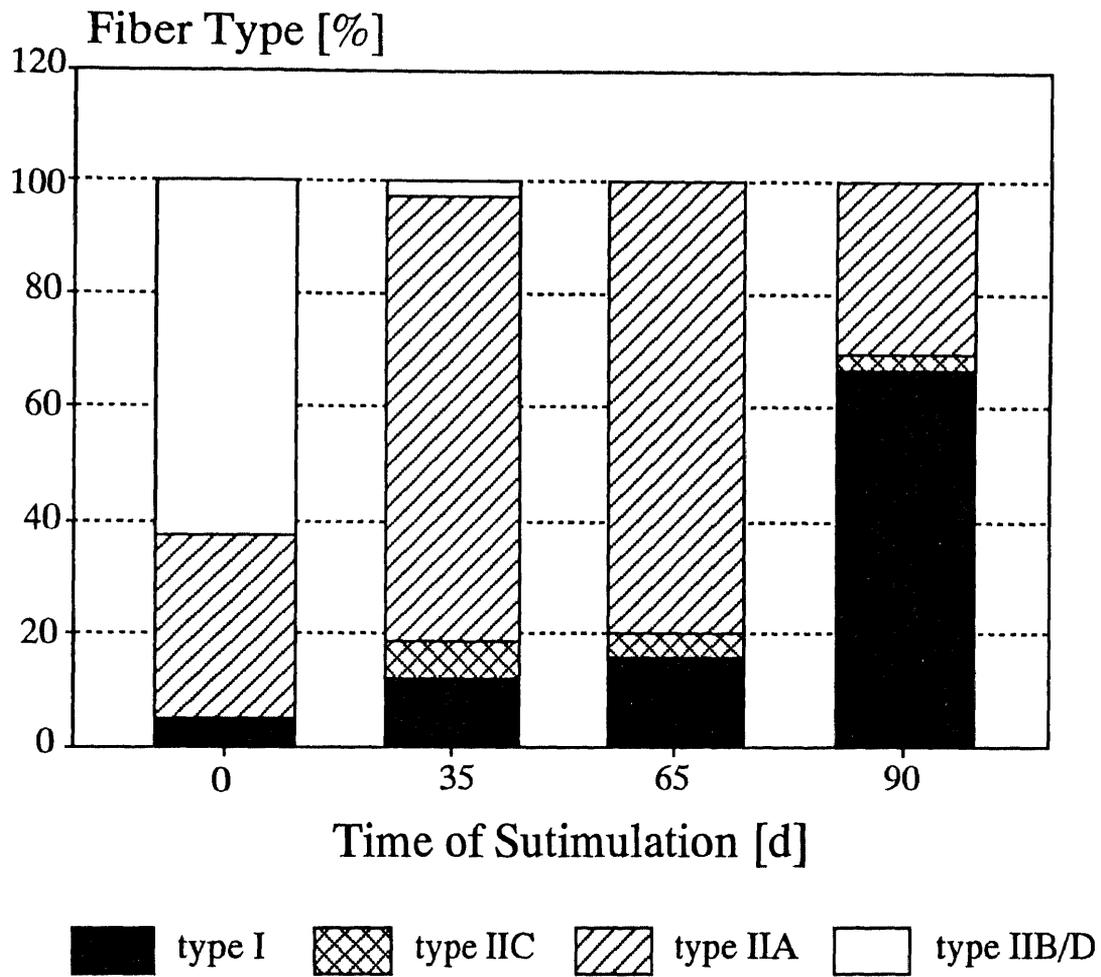


Fig. 7. Time-dependent changes in percentage distribution of histochemically classified fiber types in low-frequency-stimulated (12 hours daily) rabbit EDL muscle. (From Pette, 1992)

のである。これらのことから、収縮活動量の増加に伴って齧歯類骨格筋では図8-aに、またヒトでは電気刺激を施した例はもちろん無いが、トレーニングによる筋線維組成の変化 (Andersen & Henriksson, 1977) などから、図8-bに示される順序で移行するとみなして間違いない。なお、収縮活動量の増加に伴うtype I 線維の増加は、ここで述べたtype IIA 線維からのタイプ移行が主な要因ではあるが、それだけではなく、割合としては少ないがtype II 線維が壊死しtype I 線維が新生することにも原因がある (Maier & Pette, 1987; Maier et al., 1988)。

図7にみられるように、type IIA 線維からtype I 線維への移行と比べtype II 線維間での移行は極めて早期に起こり、このことはタイプ移行といっても、その顕在化に必要な活動量の変化の閾値は筋線維タイプ間で著しく異なることを示唆する。ヒト骨格筋においてもtype IIC 線維は約1%しかみられないのに対し、type IIAB 線維は10%以上も存在することが確認されており (Sraton, 1991)、この示唆を裏付ける知見である。トレーニングによってtype I 線維の増加が生じにくいのは、筋線維の動員パターンとも関連して、type IIA 線維に対し移行が起こりうる閾値を超える活動量の増加をもたらすことが、困難であるためであると考えられる。また、協同筋を切除し、残存の筋における活動量を増加させるモデルでは、type IIB/D 線維からtype II A 線維への移行だけでなく、type IIA 線維からtype I 線維への移行も生ずるが (Oakley & Gollnick, 1985)、type I 線維の増加率は電気刺激におけるものほど大きくはない。

ここで注意をしなければならない点は、図8はtype IIB 線維を活動させ

a Rodent muscle

type I ← type IIC ← type IIA ← type IIAD ← type IID ← type IIDB ← type IIB

b Human muscle

type I ← type IIC ← type IIA ← type IIAB ← type IIB

Fig. 8. Increased contractile activity-induced transformation of histochemically typed fiber in rodent (a) and human (b) muscle.

続けていれば、いつかはそれが完全にtype I 線維になることを意味しているのではないことである。図7に示されるように、長指伸筋に対して90日間電気刺激を続けても全てがtype I 線維になることはない。これに加え、さらに長期間(150日)電気刺激を施してもfast type LCは完全に消失しないこと (Seedorf et al., 1983)、あるいは電気刺激に伴いtype II A 線維から移行してきたと思われるtype I 線維は、LC1sおよびLC2sに加えLC1fを発現していること (Staron et al., 1987) などが認められている。これらのことは、収縮活動量の変化に応じて筋線維はタイプ移行するが、それぞれの筋線維タイプ毎に遺伝的にプログラミングされた固有の特性があり、その適応範囲内でしか変化が起こらないことを示すものと考えられる。

B. ミオシン重鎖および軽鎖の変化

収縮活動量の増大に伴うHCIIBの減少およびHCIIAの増加は、比較的早期に起こり、電気刺激の開始後約1週間前後で変化を観察することができる(Termin et al., 1989a)。しかしながら、このタンパクレベルでの変化はmRNAレベルでの変化と同期して起こるわけではない。HCIIBをコードするmRNA(HCIIB-mRNA)は刺激開始わずか2日後に減少が始まり、1週間後にはほとんど検出されなくなる(Kirschbaum et al., 1989b)。HCIIA-mRNAについてもそのタンパクに先立ち変化がみられ、刺激開始後2~4日後には増加が認められる(Kirschbaum et al., 1989b)。このように、タンパクレベルでの変化とmRNAレベルでの変化との間に時間的なズレがあるのはなぜであろうか。第一に考えられるのは、mRNAがタンパクへと翻訳される段階

で何らかの調節機構が存在することだが、HCIIAおよびHCIIDに関してそのmRNAが増加している時期に並行して合成速度が増大していることが認められており (Termin & Pette, 1992)、この可能性は小さいといわざるをえない。

最もありえることは、タンパクの分解速度の関与である。fast type HCの半減期は14~17日であるといわれており (Gagnon et al., 1990; Termin & Pette, 1992)、電気刺激に伴いDNAからHCIIB-mRNAへの転写がほとんど停止したとしても、既存のHCIIBは直ぐに分解・減少するわけではない。したがって、新たに合成されたHCIIDあるいはHCIIAは、HCIIBが分解・減少した後、サルコメアに取り込まれ初めてフィラメントとして機能するのであろう。それ以前、すなわちHCIIBの分解が盛んになり、多くのHCIIBがサルコメアから離脱し始める前は、合成された大部分のHCIIAおよびHCIIDは細胞内に遊離した状態にありこれらは容易に分解へと進むであろうから、これがタンパクレベルでの変化とmRNAレベルでの変化との間に時間差が生じる要因であると思われる。

LCは筋線維タイプには直接影響しないが収縮特性に関与し (Bottinelli et al., 1993; Lowey et al., 1993)、HCと同様に移行に伴いアイソフォームの分布が変化する。電気刺激がLCのアイソフォームの分布に及ぼす第一の影響は、fast type alkali LC (LC1fおよびLC3f) に観察されるが、HCと同様にタンパクレベルでの変化とmRNAレベルでの変化とは一致していない場合がある。刺激開始約2週間後に、LC1f-mRNAの増加およびLC3f-mRNAの減少が観察される (Kirschbaum et al., 1989)。これをタンパクレベルでの変

化と比較すると、LC1fではタンパクとmRNAとはほぼ並行して推移するが、LC3fではタンパクの減少量はmRNAのそれを大きく上回る。この原因については必ずしも明確ではないが、HCとLCとの親和性と関連があるのではないかとされている。すなわち、LC3fのHCに対する親和性はHClIA < HClID < HClIBの順で高く、活動量の増加によってHClIBが減少するためHCと結合しないLC3fが増加し、これらが結合しているものと比べ速やかに分解されるのではないかというのである。

さらに長期間電気刺激を継続すると、HCIおよびLCsの増加が起こるが、両者が相互にどのような経時的変化を示すのか、あるいはこれらをコードするmRNAの変化とどのような対応関係にあるのかについての詳細は、明らかになっていない。

C. 筋線維のタイプ移行を引き起こす要因

これまで述べてきたように、収縮活動量の増加は筋線維のタイプ移行をもたらす。また、ここでは触れなかったがミオシンだけではなく、ミトコンドリアや筋小胞体などに代表されるように、筋線維内の他の多くの構成要素にも定量的あるいは定性的な変化が生じる。これらは活動量が増したことによって、細胞内においてシグナルとなる物質に何らかの変化が起き、それが直接、あるいはカスケード反応の結果として、遺伝子に働きかけタンパクの発現が変化したためである。そのシグナルとは何なのであろう。

収縮活動量の増大により極めて早期に起こる変化は、筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の低減 (Leberer et al., 1987) やCa²⁺結合タンパクであるPAの

減少 (Leberer et al., 1986) に起因する細胞内遊離 $[Ca^{2+}]$ の増加である。 Ca^{2+} はタンパクの合成・分解速度を調節することから (Lewis et al., 1982)、筋線維のタイプ移行を起こすシグナルの第一候補として考えられてきた。しかしながら、電気刺激に伴う筋線維内 $[Ca^{2+}]$ の経時的変化を検討したSreter et al. (1987) の報告は、 $[Ca^{2+}]$ は刺激開始直後から増加し始め3日後にはピークを迎えるが、その後減少し約3週間後にはほぼ元の値になったことを示している。type I 線維の占有率の増加は刺激開始後3～4週間以降始まり、その後長期にわたって継続する。これらの事実からは、mRNAの変化とタンパクの変化の時間的なズレを考慮しても、 $[Ca^{2+}]$ の変化がtype IIA 線維からtype I 線維への移行のトリガーとして作用しているとは考えにくい。

近年、 Ca^{2+} に代わってATPの濃度($[ATP]$)が筋線維のタイプ移行のトリガーとして注目されている。 β -グアニジノプロピオニック酸 (β -GPA) はクレアチンのアナログであるが、クレアチンキナーゼに対する基質としてはクレアチンより K_m が高く、親和性の低い物質である。これを飼料に混ぜ数週間ラットに与え続けると、筋内の $[ATP]$ が減少することが知られている(Shoubridge & Radda, 1987)。このような処置を施したラットの筋では、その程度は小さいものの、有酸素系代謝能力の向上 (Shoubridge et al., 1985)、LC3fおよびPAの減少 (Moerland et al., 1989)、あるいはslow typeミオシンの増加 (Moerland et al., 1989)など、電気刺激に起因してみられるものと同様の変化が起こる。さらに、ヒトミトコンドリアゲノムにおける転写速度および転写パターンは、 $[ATP]$ に影響されることも報告さ

れている (Gaines et al., 1987)。[ATP]は電気刺激開始15分後には既に減少しており、それは刺激が継続されている間、回復することはない (Green et al., 1992)。これらのことから、アデニレイト系のリン酸化能力が筋細胞における表現型を調節し、筋線維のタイプ移行においてもそれがトリIGGERになるものと推測される。

III. 研究目的および研究課題

骨格筋線維におけるHCおよびLCのアイソフォームの分布および持続的な運動に伴うそれらの変化を明らかにすることを目的とし、以下の研究課題を設定した。

実験 I 高強度・持久トレーニングによる筋線維組成およびミオシン軽鎖の変化

長期間にわたる持久トレーニングが速筋 (type II) 線維から遅筋 (type I) 線維への移行の誘因刺激となるか否か、また、それに伴いLCのアイソフォームがどのように変化するかを検討する。

実験 II 協同筋切除によるミオシン重鎖および軽鎖の変化

収縮活動量が著しく増加した筋におけるHCおよびLCのアイソフォームの変化を経時的に検討する。

実験 III ラットおよびラビットの単一筋線維におけるミオシン軽鎖の分布

fast type alkali LC (LC1fおよび3f) が単一筋線維内に特異的に分布しているか否かを検討する。

実験 IV ラビット単一筋線維におけるアイソミオシンの分布

PPI-PAGEによって単一筋線維において発現しているアイソミオシンを検出し、各アイソミオシンのゲル上の挙動およびその分布について検討する。

実験 V ヒト骨格筋におけるミオシン重鎖と軽鎖の親和性

ヒト骨格筋の筋線維組成とLCの分布を分析し、HCとLCの間の親和性について検討する。

IV. 高強度・持久トレーニングによる筋線維組成およびミオシン軽鎖の変化 (実験 I)

1. 目的

骨格筋においてその収縮速度の主たる決定因子がmATPase活性であり (Bárány, 1967)、この酵素の生化学的に測定される活性値と組織化学的染色に基づき類別される筋線維タイプとの間に対応関係があることが明らかにされ (Guth & Samaha, 1969)、スポーツ適性という側面から筋に占める筋線維タイプの分布比率、いわゆる筋線維組成が注目されるようになった。

1972年のGollnick et al. (1972) 以来、各種競技種目選手の筋線維組成が報告され (Costill et al., 1976a; Costill et al. 1976b; Coyle et al. 1979)、あるスポーツ種目で成功を収めるためには、そのスポーツの運動様式に適合した筋線維組成を持つことが、多くの場合必要条件になることが明らかになった。筋に占める速筋 (type II) 線維と遅筋 (type I) 線維の比率は、主として遺伝的な要因により決定され、生体を取りまく環境やトレーニングなどの後天的な因子によっては影響を受けにくいことが、ヒトや動物を用いたトレーニング実験、あるいは一卵性双生児を対象としたこれまでの研究から認められてきた (Komi et al., 1977; Schantz et al., 1982; Howald et al., 1985)。

しかしながら、非生理学的ではあるが協同筋の切除 (Baldwin et al., 1982; Roy et al., 1985)や電気刺激 (Pette et al., 1976; Staron et al., 1987)などの方法により人為的に筋の収縮活動量を著しく増大させると、収縮特

性の指標となる幾つかのパラメーター（筋線維組成、ミオシンのアイソフォームの分布など）に収縮速度の低減を示唆する変化がみられることが知られている。したがって、これまでのトレーニング実験においてそのような変化が起こらなかったのは、用いられたトレーニングの質（運動強度）あるいは量（1回の運動時間、トレーニングの頻度や期間）のどちらか一方あるいは両方が十分でなかったため、収縮タンパクの発現状態に影響を及ぼすほどtype II 線維を刺激しえなかったためであろうと推察される。

そこで本実験では、長期間に渡る激しい持久トレーニングによって生じる骨格筋における変化を、組織化学的手法に加え電気泳動学的手法により検討することを目的とした。

2. 方 法

A 実験動物およびトレーニング

実験にはWistar系雄ラット26匹を用いた。これらを12時間の明暗サイクルの照明下で、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ に常時維持した飼育室において、2匹ずつ同一ケージ内で飼育した。なお、水と飼料は自由摂取とした。

4週齢より小動物用トレッドミル（夏目制作所製KN73）を用い、1週間の予備トレーニングを行った。予備トレーニングでは 25 m/min で30分まで走行させ、その走行成績と体重から等質グループになるように以下の4群に分けた。トレーニング群としては、8週間トレーニングを負荷するT8群 ($n=6$)、16週間トレーニングを負荷するT16群 ($n=6$) を設けた。また、それぞれのコントロール群をC8群 ($n=6$)、C16群 ($n=8$) とし、トレーニング群

には5週齢より走行トレーニングを開始した。

表6にトレーニングのプロトコールを示した。走速度 30 m/min、走行時間 20 min/day から始め、走速度と走行時間の両者を漸増し、T8群の最後のトレーニングにあたる第8週目には40m/min、120min/dayに達した。以後走行時間のみを漸増し、最終週第16週目の走行時間は 240 min/day であった。疲労困憊になり連続走行が不可能となったラットには、随時休息をおき規定の時間走行させた。なお、トレーニング頻度は週5回であった。

B 組織化学的分析

最終トレーニング終了48時間後、エーテル麻酔下にて両肢から長指伸筋(EDL) およびヒラメ筋(SOL)を摘出し、片方を組織化学的分析に、もう一方を電気泳動学的分析にあてた。摘出した筋の筋腹付近を数mmに横断し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷凍した。クリオスタット(-20℃)中で厚さ約10μmの連続横断切片を作成し、mATPase染色(Padykula & Herman, 1955) およびNADH-TR (Nachlas et al., 1958) を施した。mATPase染色におけるpreincubationのpHは10.3、また浸漬時間は10分(37℃)であった。得られた標本の光学顕微鏡写真から、Peter et al. (1972)の方法に従い筋線維をSO、FOGおよびFG線維に分類した。筋線維組成は横断面の全筋線維をカウントすることによって算出した。

C 電気泳動

Table 6. Programs of progressive endurance training.

Age (wk)	Speed (m/min)	Duration (min/day)	T8	T16
5	30	20	↑ ↓	↑ ↓
6	30	30		
7	30	60		
8	40	60		
9	40	75		
10	40	90		
11	40	100		
12	40	120		
13	40	120		
14	40	120		
15	40	180		
16	40	210		
17	40	240		
20	40	240		

Values are based on the final run for each week.

Sessions were 5 times per week.

ガラスホモジナイザーを用い、40倍の抽出液中で筋をホモジナイズした。抽出液の組成は8 M グアニジン塩酸、0.1 M Tris-HCl pH 7.5、10% (vol./vol.) メルカプトエタノール、0.01 M ピロリン酸ナトリウムであった。筋タンパクを含む抽出液を5 M 尿素、1 Mチオ尿素、0.17% (vol./vol.) メルカプトエタノール、および0.15 M ピロリン酸ナトリウムから成る溶液中で、4時間(0℃)透析した後、一次元目の泳動に用いた。

LCの分布は、一次元目を等電点電気泳動、二次元目をSDS-PAGEとする二次元電気泳動から検討した。等電点電気泳動における支持体には、Hirabayashi (1981)の方法に従ってアガロースを用いた。ホモジネイト60 μ lをディスクアガロースゲル上に負荷し、500 Vで24時間、6℃の条件下で通電を行った。一次元目の泳動終了後、10% (mass/vol.) トリクロロ酢酸、5% (mass/vol.) スルホサリチル酸を含む溶液中で1時間タンパクを固定し、直ちに二次元目の泳動を行った。

不連続系SDS-PAGEは、Laemmli (1970)の原法を修正したHirabayashi (1981)の方法に従って行った。アクリルアミドに12-20%の濃度勾配がついたものをセパレイティングゲルとして用いた。通電はスタッキングゲル中は30 mA、セパレイティングゲル中は70 mAであった。クーマシーブリリアントブルー染色を施した後、画像解析システム(NEC社製PC-8001MK II、日本ピーシーシステムズ社製写楽)により、LCの相対的分布を算出した。

3. 結 果

A 筋線維組成

表7にヒラメ筋および長指伸筋の筋線維組成を示した。ヒラメ筋では両トレーニング群ともにSO線維の占有率が高い傾向にあり、T16群に有意な差異 ($p<0.05$) が認められた。一方長指伸筋では、SO線維には有意な差異は認められなかったが、速筋のサブグループに変化がみられ、両トレーニング群ともにコントロール群と比べ、FOG線維に高値が、FG線維に低値が観察された。

B ミオシン軽鎖

表8にヒラメ筋、表9に長指伸筋におけるLCの各アイソフォームの分布を示した。ヒラメ筋ではfast type LCはごく微量しか存在せず、特にLC3fについては全く検出されないものが全体の約4割を占めた。トレーニング群とコントロール群を比較すると、T8群、T16群ともにslow type LCが増加、fast type LCが減少する傾向にあったが、統計的には有意ではなかった。一方、長指伸筋ではLC3fに変化が観察され、C16群と比べT16群の値に低値 ($p<0.05$) が認められた。

4. 考 察

これまで持久トレーニングに起因してtype II 線維のサブグループ間にタイプ移行が起ることは報告されてきたが(Andersen & Henriksson, 1977)、一卵性双生児では二卵性双生児と比べペア間のtype I 線維 (あるいはtype II 線維)の占有率が酷似していること(Komi et al., 1977)、また多くのトレーニング実験(Andersen & Henriksson, 1977;勝田ら, 1984;勝

Table 7. Comparison of relative muscle fiber composition (%) in control and trained groups.

Group	N	SOL		EDL		
		SO	FOG	SO	FOG	FG
C8	6	79.9 ± 5.7	20.1 ± 5.7	3.1 ± 1.5	39.6 ± 2.4	57.3 ± 3.2
T8	6	85.8 ± 6.0	14.2 ± 6.0	4.0 ± 1.9	48.4 ± 6.4 *	47.6 ± 6.1 **
C16	8	85.5 ± 5.7	14.5 ± 5.7	3.2 ± 1.4	38.0 ± 4.0	58.8 ± 3.1
T16	6	91.8 ± 2.7 *	8.2 ± 2.7	3.8 ± 1.2	45.7 ± 3.4 **	50.5 ± 3.3 **

Values are means ±SD. * and ** denote statistically significant ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) differences between C8 and T8 and between C16 and T16.

Table 8. Percentage distribution of myosin light chain (LC) isoforms in the soleus muscle of control and trained rats.

Group	N	slow type LC		fast type LC		
		LC1s	LC2s	LC1f	LC2f	LC3f
C8	6	43.1 ± 3.6	41.2 ± 3.2	4.7 ± 3.3	9.8 ± 3.5	1.2 ± 2.5
T8	5	43.9 ± 4.2	43.5 ± 5.1	3.9 ± 2.2	8.2 ± 4.6	0.5 ± 0.9
C16	5	49.0 ± 4.3	43.1 ± 3.9	3.4 ± 3.3	4.3 ± 3.5	0.2 ± 0.3
T16	6	49.1 ± 2.4	46.6 ± 3.4	0.7 ± 1.2	3.5 ± 0.8	0.1 ± 0.2

Values are means ± SD.

Table 9. Percentage distribution of myosin light chain (LC) isoforms in the extensor digitorum longus muscle of control and trained rats.

Group	N	slow type LC		fast type LC		
		LC1s	LC2s	LC1f	LC2f	LC3f
C8	6	3.6 ± 2.3	4.2 ± 3.0	30.1 ± 4.6	43.7 ± 4.8	18.4 ± 6.3
T8	6	2.4 ± 3.4	5.1 ± 5.0	32.9 ± 4.7	43.9 ± 8.0	14.7 ± 3.1
C16	8	0.9 ± 0.8	2.5 ± 2.1	32.1 ± 3.9	46.4 ± 4.2	18.1 ± 2.9
T16	5	0.8 ± 1.2	1.9 ± 1.9	33.9 ± 5.6	51.1 ± 8.3	12.3 ± 5.3*

Values are means ± SD. Statistical significance: Control vs. trained, *P < 0.05.

田ら, 1985)ではtype I 線維とtype II 線維の比率は変化しなかったことなどから、type I 線維とtype II 線維の割合は後天的要因により変化しにくいとされてきた。

しかしながら、Petteらの一連の研究(Bar et al., 1989; Pette, et al., 1976; Reichmann, et al., 1985; Reichmann et al., 1991; Staron, et al., 1987; Termin et al., 1989a)から明確になったように、筋を支配する神経に電極を埋め込み、1日12時間以上電氣的に筋を刺激し続けその収縮活動量を著しく増加させると、このような処置を受けた速筋は遅筋と極めて類似した特性を有するようになり、組織化学的には刺激前type I 線維の占有率が数%であったものが90%以上に増加することが認められている(Staron et al., 1987)。このtype I 線維の増加は主として既存のtype II 線維内でslow type HC (HCI)が合成されるようになりtype I 線維へと移行することに原因があり、これらの事実はtype II 線維を十分動員できる運動強度で長時間トレーニングを行えば、これまで一般に支持されてきた知見とは異なり、トレーニングによるtype II 線維からtype I 線維への移行が起こり得ることを示唆するものである。

本研究で用いた走速度は、ラットの最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_2\text{max}$)の86.8%に相当する(跡見ら, 1985)。このような運動強度を用いたのは80% $\dot{V}O_2\text{max}$ 以上の強度でtype II 線維の有氣的代謝能力に向上がみられたとするDudley et al. (1982)の報告に基づき、運動に際し多くのtype II 線維が動員されるよう考慮したものである。そして、1日4時間に及ぶ

苛酷なトレーニングを負荷したところ、ヒラメ筋においてtype I 線維の増加が観察され、これはトレーニングによるtype IIA 線維からtype I 線維の移行が起こったことを示すものであると考えられる(表7)。Maier et al. (1986) は電気刺激による収縮活動量の増大に伴って、FG線維が変性し、代わって酸化能力の高い筋線維が新生することを認め、必ずしもtype I 線維の占有率の増加の全てがtype IIA 線維からの移行だけに成因があるのではないことを指摘しているが、トレーニングによってもこのような現象が起こるかどうかについては不明である。いずれにせよ、本研究の結果は、一流持久的競技者の主働筋にみられるtype I 線維の高い占有率(Costill et al., 1976b)は、遺伝的な要因のみならず長期にわたるトレーニングがある程度関与していることを示唆する。

type I 線維の増加が観察されたヒラメ筋では、slow type LC (LC1sおよびLC2s)も増加する傾向にあったが統計的に有意にはいならず(表8)、この原因についてはよく分からない。長指伸筋ではtype I 線維とtype II 線維との間に移行はみられなかったが、トレーニングに伴いLC3fの減少が認められた(表9)。Thomason et al. (1986)は、LC3fから成るミオシン分子はLC1fから成るものよりmATPase活性が高いことを示しており、これに従えば本実験でみられたLC3fの減少はトレーニングによってtype II 線維の収縮速度が低減したであろうことを示唆し、組織化学的には検出できなかった変化を電気泳動法を用いることにより、より詳細に検討できる可能性が示された。

以上のことから、高強度・持久トレーニングを量的に十分行うことに

より、骨格筋ではHClの合成が促進され、組織化学的な筋線維タイプにおいてはtype II 線維のサブグループ間のみならず、type II 線維からtype I 線維への移行も起こるであろうことが示唆された。

5. 要 約

高強度・持久トレーニングによる骨格筋の適応について検討する目的で、生後5週齢のWistar系雄ラットをT8群とT16群に分け、T8群には8週間、T16群には16週間のトレッドミル走を負荷し、電気泳動的・組織化学的分析を行い、以下の結果を得た。

- 1) 筋線維組成については、長指伸筋では両トレーニング群にFG線維の減少、FOG線維の増加が、またヒラメ筋ではT16群にSO線維の増加が認められた。
- 2) ミオシン軽鎖(LC)については、ヒラメ筋では変化が認められなかった。一方、長指伸筋ではT16群にLC3fの減少が認められた。

これらのことから、高強度・持久トレーニングを量的に十分行うことにより、特定の筋ではtype II 線維からtype I 線維へのタイプ移行が起こり、筋の収縮特性はslow typeへとシフトするであろうことが示唆された。

V. 協同筋切除によるミオシン重鎖および軽鎖の変化 (実験 II)

1. 目的

現在骨格筋の組織化学的分類法として広く用いられているものは、mATPase活性のpHに対する感受性に基づいた方法であり (Brooke & Kaiser, 1970a, b)、これにより筋線維はtype I 線維とtype II 線維に大別され、type II 線維はさらにtype IIA 線維とtype IIB/D 線維に細分される。この組織化学的なmATPase活性の高低はミオシンフィラメントの性質に依存するが、その中でもHCのどのアイソフォームが分布しているかが特に重要であることが明らかになっている (Staron & Pette, 1986, 1987a, b)。これはmATPase活性に基づき分類される各筋線維は、それぞれ特有のHCのアイソフォームを細胞内に発現していることを意味し、type I 線維にはHCIが、type IIA 線維にはHCIIAが、type IIB/D 線維にはHCIIB含まれるとされてきた。

HCの検出にはSDS-PAGEが広く用いられてきたが、近時この方法の改良により、今まで考えられてきたものより多くの種類のアイソフォームが存在することが明らかになった。前述のように、組織化学的知見からは成熟した哺乳類の骨格筋では3種類のHC (HCI、HCIIAおよびHCIIB) が発現しているとされてきたが、SDS-PAGEによって、ゲル上でHCIIAのみを示すと思われてきたバンドをさらに2つに分離できることが報告され、Bar & Pette (1988) はこのHCが横隔膜 (Diaphragm) に比較的多く発現し

ていたことから、これをHCIIDと命名した。

mATPaseがHCに存在し (Lowey, 1986)、そのために細胞内に分布するHCの種類が筋線維の収縮速度を大きく規定する要因の1つであることは広く認められている事実である。しかしながら、単一筋線維の収縮速度とLCのアイソフォームの分布について検討した幾つかの報告では、alkali LCが従来考えられていたよりも収縮速度の高低に深く関わっていることが示唆されている(Sweeney et al., 1988; Moss et al., 1990; Lowey et al., 1993)。

実験 I において、持久的な運動によってtype I 線維が増加すること、およびfast type alkali LC (LC1fとLC3f) のアイソフォームの分布比率が変化することが示された。本実験ではこのようなミオシンフィラメントの変容についてのさらに詳細なデータを得るために、収縮活動量の増大に伴うHCおよびLCの経時的変化について検討した。なお、協同筋を切除すると残された筋の特性が遅筋化することが明らかになっており (Baldwin et al., 1982; Noble et al., 1983)、本実験ではこの手法を持続的な運動のモデルとして用いた。

2. 方法

A 実験動物および協同筋の切除

実験には実験開始時の体重が300-350 g のWistar系雄ラット20匹を用いた。エーテル麻酔下において左脚下腿後部をメスで切開し、腓腹筋とヒラメ筋の末梢側の腱を切断、そのまま両筋を足底筋 (Plantaris) から剥離し筋

長の約半分のところで切断した後、皮膚を縫合した (Ianuzzo et al., 1976)。術後 2、4、6 および 8 週間後にそれぞれ 5 匹ずつを解剖し、左右両脚から足底筋を摘出した。なお、右脚の足底筋はコントロールとして用いた。採取した筋については、電気泳動学的分析を行うまで液体窒素中で保存した。

B 電気泳動

ガラスホモジナイザーを用い40倍の抽出液で筋をホモジナイズした。抽出液の組成は、5 M 尿素、2 M チオ尿素、10 mM ピロリン酸ナトリウム、0.1% (vol./vol.) メルカプトエタノールであった。

LCを分画するために、ミニサイズのチャンバーを使用したこと、およびSDS-PAGEにおけるアクリルアミドの濃度が15%均一であったこと以外は、実験 I で述べたものと同様の方法で二次元電気泳動法を行った。等電点電気泳動における通電時間は200 V で2時間、400 V で1時間、またSDS-PAGEにおいては20 mAで約1.5時間であった。

HCの分析にはSugiura & Murakami (1990) によるSDS-PAGEを用いた。セパレイティングゲルには、アクリルアミドに5-8%、グリセロールに30-40%の濃度勾配がついたもの (長さ約20 cm) を使用した。ホモジネイトを62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8、2% (mass/vol.) SDS、10% (vol./vol.) グリセロール、5% (vol./vol.) メルカプトエタノール、0.02% (mass/vol.) プロモフェノールブルーを含む溶液 (Incubation medium) で50倍に希釈したものを10 μ lをゲル上に負荷し、10 mAの定電流で36時間通電を行った。泳動後、

LCを分画したゲルにはクーマシーブリリアントブルー染色を、HCを分画したゲルにはOakley et al. (1980)の方法に従い銀染色を施した。HCおよびLCの定量にはデンストメーター(島津CS-9000)を用いた。

3. 結果

A ミオシン重鎖の分離パターン

本実験ではHCをより明確に検出するために長さ約 20 cmのセパレィティングゲルを用いたところ、先行研究(Bar & Pette, 1988; Sugiura & Murakami, 1990; Aigner et al., 1993)で示されている4つのバンド以外に、HCIIBよりやや移動速度の速い新たなバンドが認められた(図9)。このバンドが泳動中にHCIIBが分解されたものであるとすると、HCIIBとこのバンドの比率はどのような筋においてもほぼ等しくなると考えられるが、筋線維組成の異なる数種類の筋について調べたところ、この比率は筋によって異なっていた。また、このバンドは組織化学的にtype IIB/D線維の比率が高い筋に多く存在したこと、およびtype IIB/D線維を含まないヒラメ筋ではこのバンドは全く存在しなかったことから、これはこれまで報告されていない新しいタイプのHCであり、このHCを含む筋線維はmATPase染色ではtype IIB/D線維と類似した染色パターンを呈するものと推察される。本実験ではこのアイソフォームをHCIIB'と呼ぶことにする。

B slow type 重鎖および軽鎖の変化

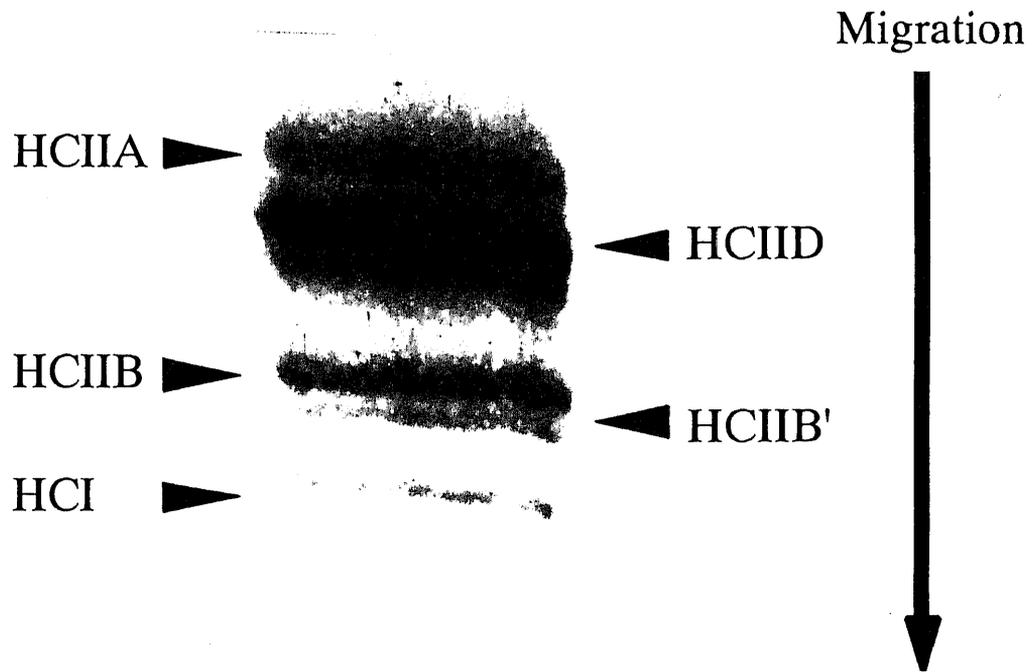


Fig. 9. Electrophoretically separated myosin heavy chain isoforms in adult rat plantaris muscle.

図10aにslow type LC (LC1sおよびLC2S)、図10bにHCIの変化を示した。両者とも極めて類似した経時的変化を示し、術後4週間まではコントロールと比べ差異はみられなかったが、6週間目以降は有意な高値が示された。8週間目において対照側に対して実験側が発現していたslow type アイソフォームは、LCで約4倍、HCで約3倍であった。

C fast type 重鎖および軽鎖の変化

図11はfast type HCの分布変化を示したものである。HCIIAは術後4週間目以降コントロールと比べ高値が認められた (図11a)。HCIIBの変化は他のものと比べ早い傾向にあり、術後2週間ですでに低下し、それは実験終了時まで継続した (図11c)。HCIIDは術後2週間目と8週間目においてのみ実験側において高値が観察され、4週間および6週間ではコントロールとの間に差異は観察されなかった(図11b)。実験側におけるHCIIB'の含有率はコントロールと比べ常に低い値が認められたが、統計的に有意であったのは術後8週間のみであった (図11d)。図12にLC1fに対するLC3fの比率を示した。この比率は術後6週以降実験側において低値が観察され、8週間における実験側の値は対照側の約67%であった。

4. 考 察

協同筋を切除することにより、残存の筋ではmATPase活性の低下 (Roy et al., 1985) あるいはtype I 線維の占有率の増加 (Oakley & Goll-

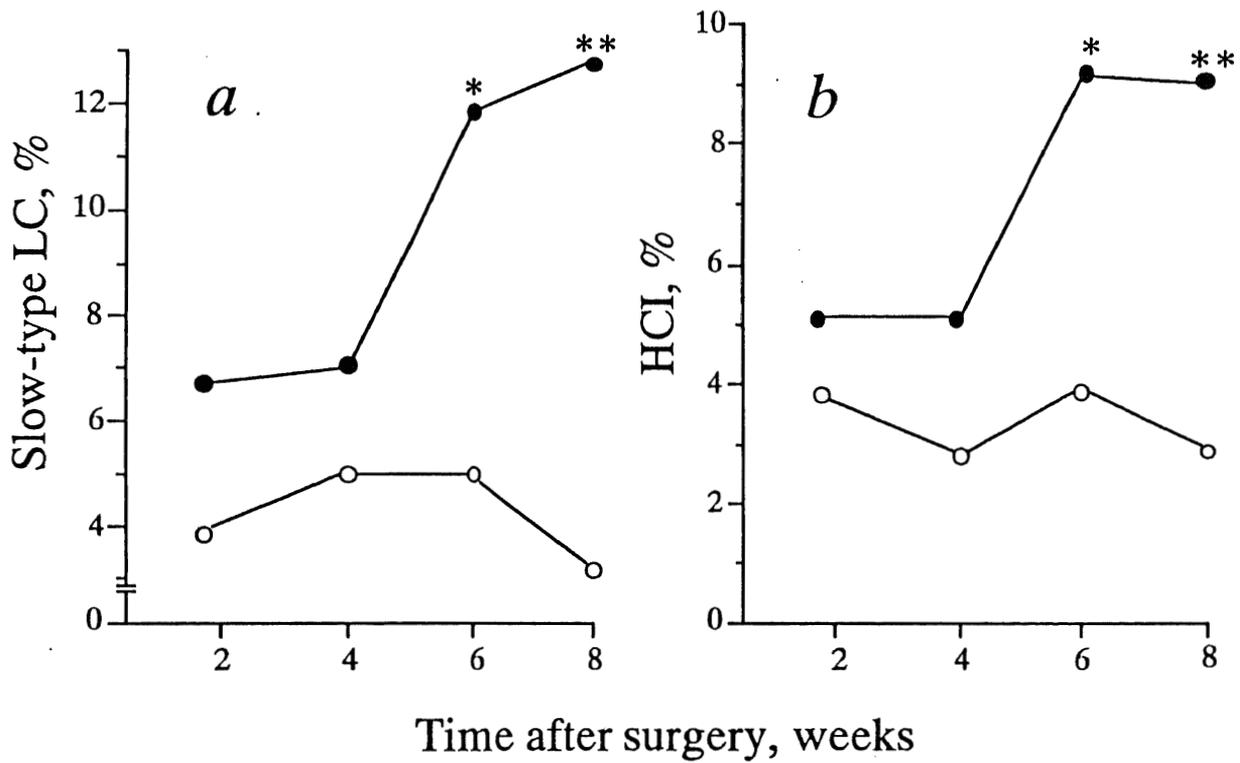


Fig. 10. Changes in the relative distribution of slow-type light chain (LC1s and LC2s; a) and HCl isoforms (b) in the plantaris muscle as a function of time following removal of synergists. ● = Experimental muscle; ○ = control muscle. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: significant differences as compared to control muscle.

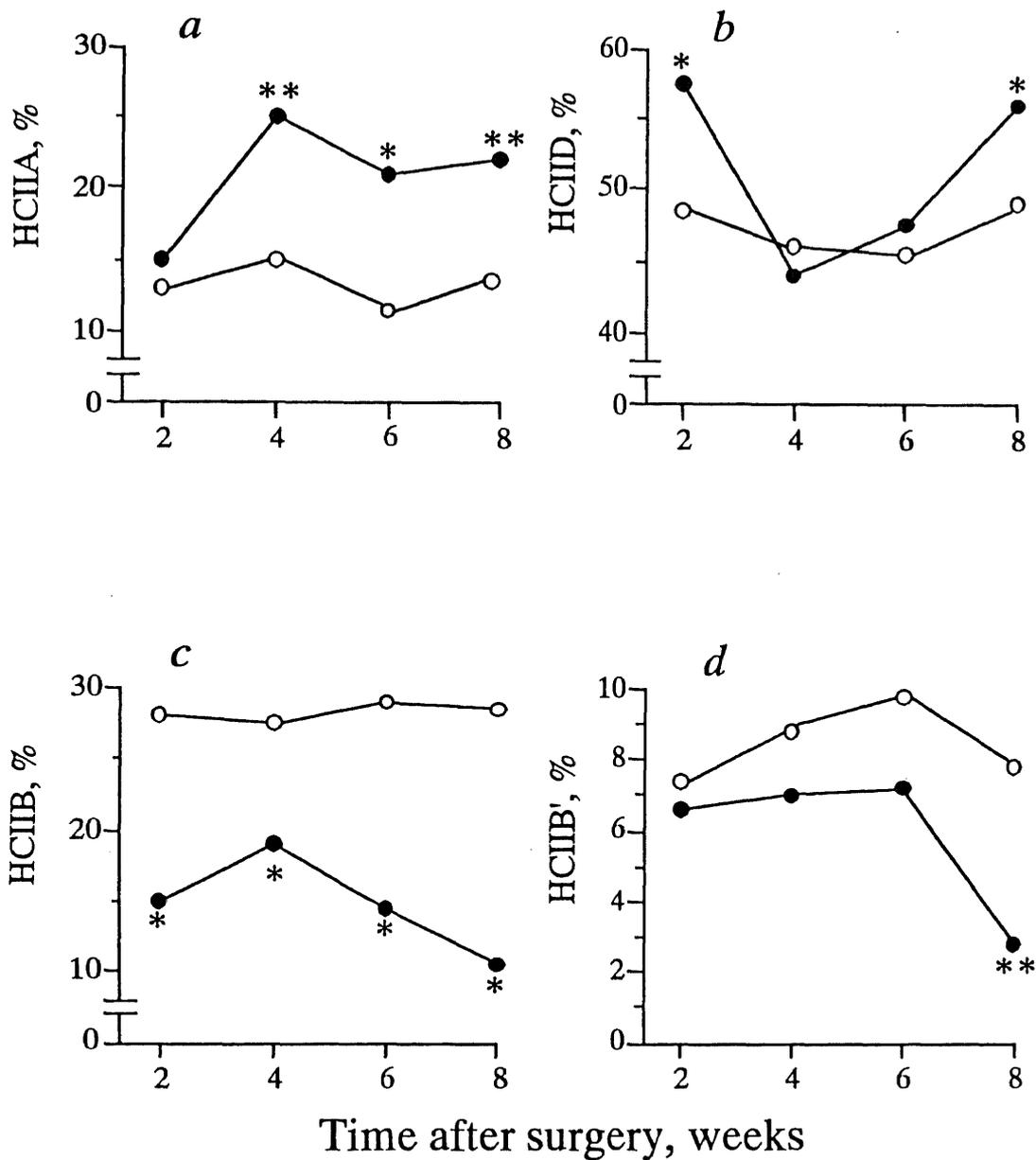


Fig. 11. Changes in the relative distribution of fast-type HCIIA (a), HCIID (b), HCIIB (c), and HCIIB' (d) isoforms in the plantaris muscle as a function of time following removal of synergists. ● = Experimental muscle; ○ = control muscle. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: significant differences as compared to control muscle.

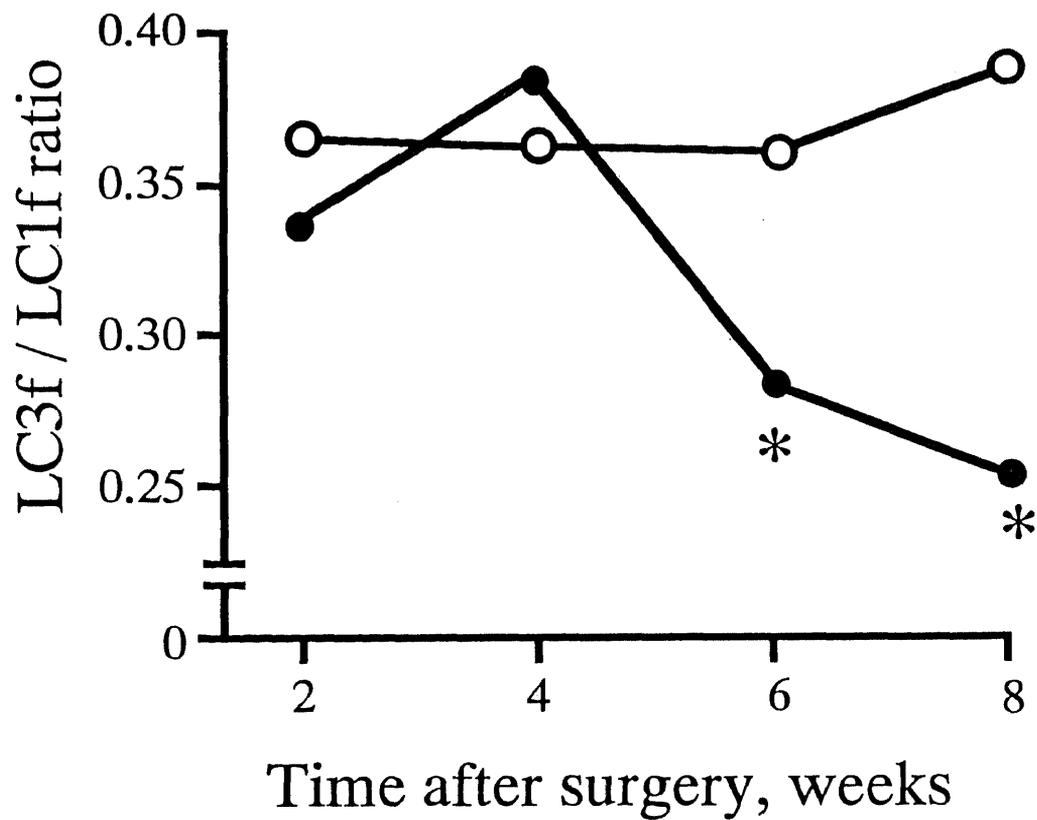


Fig. 12. Changes in the LC3f / LC1f ratio of the plantaris muscle as a function of time following removal synergists. ● = Experimental muscle; ○ = control muscle. * $p < 0.05$: significant difference as compared to control muscle.

nick, 1985) など、電気刺激や交叉神経支配が施されたものと極めて類似した変化が起こることが認められており (Pette, et al., 1976)、この手法は筋の収縮量の増加のモデルとして妥当であると思われる。

Termin & Pette (1992) は、電気刺激が与えられたラットの前脛骨筋では、刺激開始 2 日後ですでに HCIIB のメチオニンの取り込み量が減少していることを、同様に Brown et al. (Brown, et al., 1983) も刺激開始 2 日後に HCIIB にはみられないペプチドが、ラビットの前脛骨筋から検出されることを報告しており、収縮量の増加に対して HCIIB の合成量の低下および他の HC のアイソフォームの合成の促進は、極めて早期に起こる現象であることが示唆されている。図 11 に示される結果はこれとよく一致する。HC の変化の初期において観察される合成が促進されるアイソフォームとは、活動量が増加した筋では HCIIA あるいは HCIIB とともに HCIID が混在した単一筋線維が多くみられるようになることから、HCIID であると思われる (Termin, et al., 1989a)、Pette は HC についての一連の研究 (Kirschbaum et al., 1990; Pette & Staron, 1990; Pette & Vrbova, 1992; Termin & Pette, 1992) から収縮量の増加に伴って



の順で HC のアイソフォームの合成パターンが変化すると主張している。本実験では図 11b に示されるように、HCIID は術後 4 週間後および 6 週間後ではコントロールと比べ有意な差異はみられなかったが、Pette らの仮説にしたがえば、これは HC の移行が停止したのではなく、HCIIB から HCIID への移行が進行している一方で、HCIID から HCIIA への移行が

生じていることに素因があるものと思われる。この時期に認められた HClIA の増加および HClIB の減少(図11a, c) はこれを支持する結果である。

Fitzmans et al. (1990) は持久的トレーニングによって、また Tsika et al. (1987) は本研究と同様の協同筋の切除によって FM1 が減少あるいは消失することを報告しており、本研究で示された LC の変化は (図12)、これらと極めてよく一致する。しかしながら、これまで収縮活動の増加に伴うミオシンの変化を HC と LC の両方について経時的に検討した報告はなく、本研究では極めて興味深い知見が得られた。図11および図12から明らかのように、fast type HC の変化と比較すると fast type LC の変化 (LC3f の減少および LC1f の増加) は遅れて生じるが、タンパクとして発現している LC3f の量が減少してもその合成速度は大きく減少していないこと (Bar et al., 1989; Kirschbaum et al., 1989b) が報告されており、LC3f の減少は分解量の速度の増大に起因している可能性が示唆される。

Sawachak et al. (1992) は、SDS-PAGE において HClIB として同定されるバンドに抗体に対する反応性の異なる 2 種類のものがあることを観察し、HClIA、HClID、HClIB 以外にも未知の fast type HC のアイソフォームが存在することを示唆している。本実験で観察された HClIB が Scawachak et al. (1992) が示すものと同様のものであるか否かについては、免疫組織化学的分析を加えさらに詳細に検討する必要がある。また、このアイソフォームは収縮活動量の増加に伴って減少することは明らかになったが (図11d)、上述の Pette が示す移行過程のどこに位置するのか

についても、単一筋線維レベルでの検討などから明らかにすべき問題である。

5. 要 約

収縮活動量の増加に伴うミオシン重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) アイソフォームの変化を詳細に検討することを目的として、ラットに腓腹筋とヒラメ筋を切除する手術を施し、術後2、4、6、8週間後に残存の足底筋を対象に電気泳動学的分析を行い、以下の結果を得た。

- 1) slow type HC (HCI) およびLC (LC1sおよびLC2s) は、どちらも術後6週目以降に増加が認められ、fast type HCとLCの場合とは異なり両者はほぼ同期して変化することが示された。
- 2) fast type HCの中では、HCIIBが最も著しく、また早期に変化し、術後2週目に約50%の減少が認められた。HCIIAは術後4週目以降に増加することが示された。また、HCIIDは術後2週目と8週目のみに増加が観察された。
- 3) 電気泳動によるHCの分画において未知のバンドが検出され、このバンドは術後8週目に減少した。
- 4) LC1fに対するLC3fの比は、術後6週目以降に減少すること

が認められた。

収縮活動量の増加に対して、fast type 内での変化はLCよりHCにおいて早期に生じることが明らかになった。これは、HCIIBの減少がalkali LCの変化を促進しているとする推察を支持するものである。

VI. ラットおよびラビットの単一筋線維におけるミオシン軽鎖の分布 (実験 III)

1. 目的

HCにおけるS-1の一部がmATPaseを構成し (Lowey, 1986)、HCのアイソフォーム毎にこの酵素の活性値が異なるため、筋に分布する各HCの相対的な量が筋の収縮特性を主として規定するとされている (Reiser et al., 1985; Schiaffino et al., 1988)。しかしながら、それだけではなく筋小胞体の特性、パルブアルブミンの含有量、あるいはトロポニンやLCのアイソフォームの分布なども収縮速度に影響を及ぼし (Berchtold et al., 1982; Gollnick et al., 1991; Bottinelli et al., 1993; Lowey et al., 1993; Bottinelli et al., 1994)、したがって筋線維の収縮速度あるいは内因性・外因性の誘因刺激によるその変化などを検討する場合、HCに加えこれらの因子についても十分考慮する必要がある。

実験 I および II において、収縮活動量の増加に伴いLC3fが減少することが明らかになった。活動量が増加した筋ではLC3fをコードするmRNAの減少量はタンパクの減少量を下回るため、LC3fのタンパク量は、DNAからRNAへの転写のみならず、翻訳レベルあるいはタンパクの分解速度などによっても調節されていると考えられている (Barton et al., 1985; Kirschbaum et al., 1989a)。LC3fをコードするmRNAがDNAから転写されているにもかかわらず、相当量のタンパクとして発現していない機序として、LC3fがある特定のHCと結合しやすい特性を有し、そのHCが量的に減

少すると、HCと結合せず細胞内に遊離するLC3fが増加し、それらはHCと結合しているものと比べると分解されやすいことが推察されている (Bar et al., 1989)。これまでHCとLCの間に特異的な親和性を示す報告はなされていないが、仮にそのような親和性が存在するならば、少なくともtype IIA 線維にはLC1fが、それに対してtype IIB 線維にはLC3fが多く分布していなければならない。しかしながら、これまで全筋に分布するHCとLCの量から単一筋線維におけるLCの量について推測はされてきたが (Termin & Pette, 1991)、単一筋線維レベルでの報告は成されていない。そこで本実験では、ラットおよびラビットの速筋単一筋線維を対象に、発現している fast type alkali LCについて定量的に検討することを目的とした。

2. 方法

A 実験動物、単一筋線維の剥離および筋タンパクの抽出

実験にはWistar系雄ラットおよびWhite New Zealand系雄ラビットの長指伸筋 (EDL) を用いた。摘出した筋束を液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷凍し、分析まで -70°C で保存した。

単一筋線維の剥離を容易に行うために、Spamer & Pette (1977) の方法に従って筋束を以下の手順でフリーズドライした。まず、 -25°C にセットしたクリオスタット中で筋束を幅約5 mm、長さ約2 cmにカミソリで切り、予め冷却したアルミホルダーに入れた。このアルミホルダーをガラス容器に入れ、内部の環境を温度 -38°C 、気圧 10^{-3} Torr以下で24時間保持することによって、筋をフリーズドライした。これらについては、単一筋線維に

剥離するまでフリーズドライを行った時と同様の環境下で保存した。

単一筋線維の剥離は、温度20℃、湿度40%に常時維持した室内で行った。ガラス容器を内部を低圧状態のまま室温で約1時間放置した後、筋を容器から取り出し、光学顕微鏡下で単一筋線維に剥離した。剥離された単一筋線維の長さは4-8 mmであった。これらをマイクロガラスホモジナイザーに入れ、実験 II で用いたものと同様の抽出液30 μ lでホモジナイズした。15 μ lをLCの分析に、残りをHCの分析のために用いた。

B ミオシン軽鎖の分離

LCの各アイソフォームを一次元目を等電点電気泳動、二次元目をSDS-PAGEとするマイクロ二次元電気泳動法によって分画した(O'Farrell, 1975)。等電点電気泳動のゲルには、4%アクリルアミドを支持体とし、1.6% (pH 5-7) および0.5% (pH 3.5-10) アンフォラインを含むものを用い (Bar et al., 1989)、長さ75 mm、内径1.6 mmの毛細管中で泳動を行った。通電は100 Vで20分間、300 Vで80分間、コールドルーム (10℃) 内で行った。SDS-PAGEはDoucet et al. (1990) の方法を採用した。セパレイティングゲルにおける濃度は、アクリルアミド-15%、グリセロール-5%であり、通電は200 Vで約1.5時間 (室温) なされた。

なお、アクリルアミドとビスアクリルアミドの比は100:1であり、ランニングバッファーには0.1% SDS (mass/vol.)、50 mMトリス、150 mMグリシンから成る溶液を用いた。

C ミオシン重鎖の分離

HCを分画するためのSDS-PAGEは、Bar & Pette (1988)の方法を改良して行った。セパレイティングゲルには、アクリルアミドに7-10%、グリセロールに25-35%の濃度勾配がついたものを用いた。アクリルアミドとビスアクリルアミドの濃度比は100:1であった。ホモジネイト15 μ lをIncubation medium (実験 II 参照) で約2倍に希釈した溶液10 μ lをゲル上に負荷し、120Vで24時間通電した。セパレイティングゲルの高さは約9cm、厚さは0.75 mm であった。含まれるHCのアイソフォームの種類に従って、各筋線維をtype IIA、type IIB、およびtype IID 線維に分類した。

D ゲルの染色およびミオシン軽鎖の定量

LCおよびHCを分離するために得られたゲルには、Oakley et al. (1980)の方法に従って銀染色を施した。また、LCの定量にはビデオカメラとイメージプロセッサから構成されるイメージプロセッシングシステム (Syncotec, Asslar, Germany) を用いた。

3. 結果

A. 単一筋線維に発現しているミオシン重鎖

長指伸筋におけるほとんどの筋線維は、HCI、HCIIA、HCIIDあるいはHCIIBのいずれか1種類のみHCを含んでおり、それぞれtype I、type IIA、type IID、type IIB 線維と同定された (図13)。また、わずかではあるがHCIIAとHCIID、HCIIDとHCIIBあるいはHCIIAとHCIの2種類を混

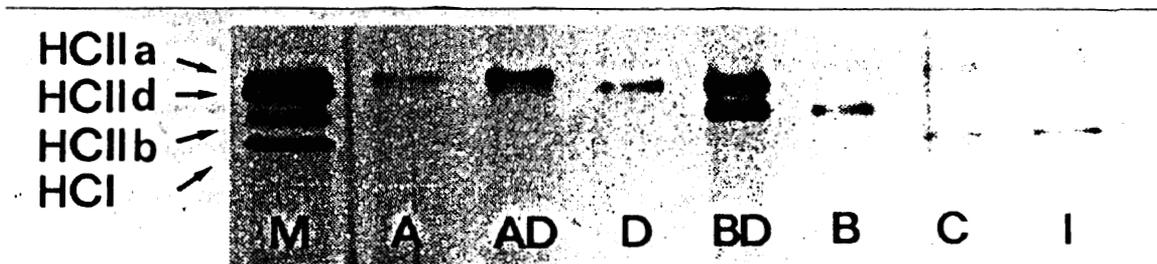


Fig. 13. Separation of myosin heavy chain isoforms in single fibers from rat extensor digitorum longus muscle by gradient polyacrylamide gel electrophoresis. Abbreviations: A, type IIA fiber; AD, type IIAD fiber; D, type IID fiber; BD, type IIBD fiber; B, type IIB fiber; C, type IIC fiber; I, type I fiber; HClIa, HClId, HClIb, fast myosin heavy chain isoforms; HClI, slow myosin heavy chain; M, marker (whole muscle extract)

在した筋線維もみられた。このような混在型の筋線維は得られた数が僅かであったため、本研究の対象から除外した。

B ラット単一筋線維におけるミオシン軽鎖の分布

全てのtype II 線維は2種類のfast type alkali LC (LC1fおよびLC3f) を含んでおり、LC1fあるいはLC3fのどちらか一方のみを発現しているものは観察されなかった。また、fast type LCに加えslow type LCを発現しているものも認められなかった。

図14に単一筋線維におけるLCの発現パターンを示した。LCの発現パターンは、LC3fを多く含有するもの(図14a)、少量含有するもの(図14c)、その中間のもの(図14b)の3種類に大きく分類された。パルブアルブミン(PA)の発現量もLC3fと類似しており、LC3fを多く含む筋線維ほどPAの含有量も高い傾向にあった。

図15および表10にラット単一速筋線維におけるalkali LCの分布をまとめた。alkali LC (LC1fおよびLC3f) に対するLC3fの比は、平均値ではtype IIB > type IID > type IIA の順で高く、それぞれの筋線維タイプ間の差異は統計的に有意であった(表10)。しかしながら、個々の筋線維内ではこの比のばらつきは大きく、3タイプの筋線維間でオーバーラップする部分が認められた(図15)。

C ラビット単一筋線維におけるミオシン軽鎖の分布

表11にラビットの筋線維におけるalkali LCの含有量を示した。ラビット

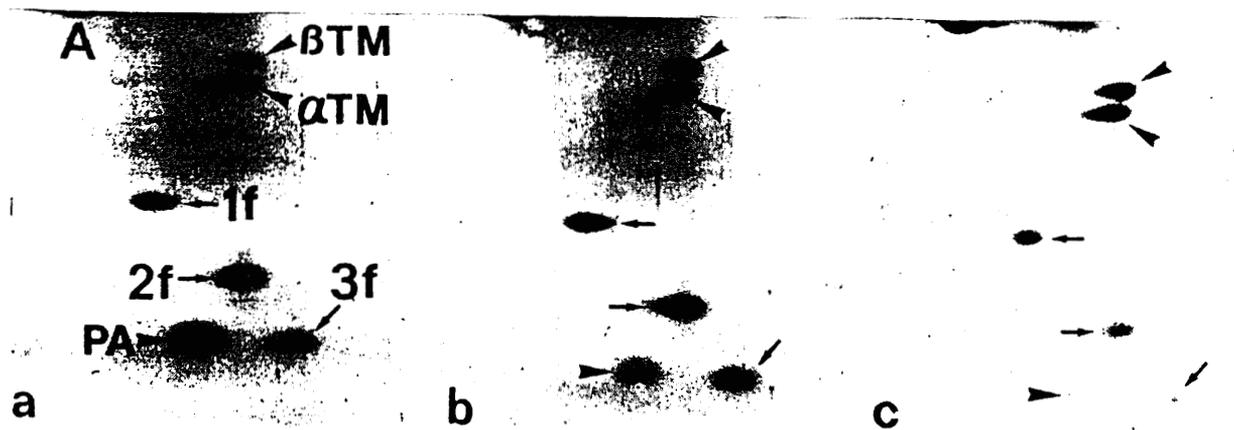


Fig. 14. Silver-stained two-dimensional electrophoresis of extracts from single type IIB (a), type IID (b), and type IIA (c) rat muscle fibers. Abbreviations: A, actin; 1f, 3f, alkali light chains LC1f and LC3f; 2f, regulatory light chain LC2f; PA, parvalbumin; TM, tropomyosin

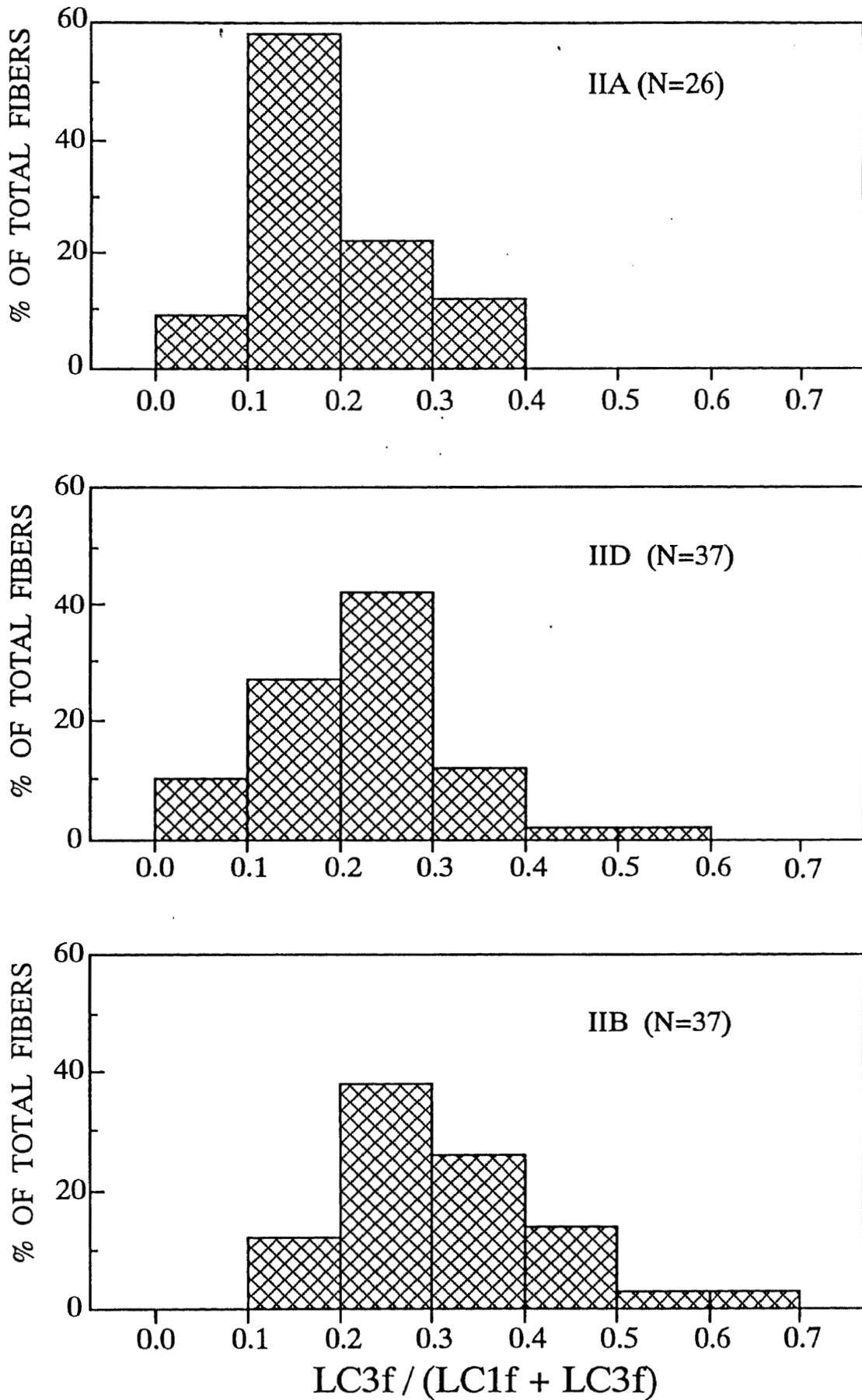


Fig. 15. Histograms of the relative concentration of LC3f in microdissected pure type IIB, IID, and IIA fibers of rat extensor digitrum longus muscle.

Table 10. Relative concentration of the fast alkali light chain LC3f in three fast fiber types from rat extensor digitorum longus muscle. Values (means \pm SD) were calculated from the results obtained by densitometric evaluation of two-dimensional electrophoreses on extracts from single fibers; N = number of fibers.

Fiber type	N	LC3f / (LC1f + LC3f)
IIA	26	0.176 \pm 0.073
IID	37	0.230 \pm 0.108 ^a
IIB	37	0.322 \pm 0.113 ^{b,c}

^a p < 0.05 for IIA vs. IID

^b p < 0.01 for IIA vs. IIB

^c p < 0.01 for IID vs. IIB

Table 11. Relative concentration of the fast alkali light chain LC3f in two fast fiber types from rabbit extensor digitorum longus muscle. Values (means \pm SD) were calculated from the results obtained by densitometric evaluation of two-dimensional electrophoreses on extracts from single fibers; N = number of fibers.

Fiber type	N	LC3f / (LC1f + LC3f)
IIA	9	0.232 \pm 0.091
IID	25	0.310 \pm 0.113

からはtype IIB 線維を剥離することができず、type IIA 線維とtype IID 線維についてのデータしか得られなかった。ラット同様LC3f / (LC1f+LC3f) は、type IIA線維よりtype IID線維において高い傾向が観察されたが、統計的には有意ではなかった。また、slow type とfast type の両方を含む単一筋線維は存在しなかった。

4. 考 察

電気刺激などの処置により筋の収縮活動量が著しく増加した筋では、type IIA 線維からtype I 線維へと筋線維タイプの変換が起こり、そのような移行によって新たにtype I 線維になった筋線維では、slow type LCに加えLC1fを発現していることが認められている (Staron et al., 1987)。これに対して、正常な筋ではそのようなLC混在型筋線維は全く存在しないわけではないが、その数は極めて少ないと考えられてきた (Billeter et al., 1981; Staron & Pette, 1987a, b)。近年、正常な筋においても従来考えられていたより多くの混在型線維がみられるとする報告がなされているが (Sugiura et al., 1992b; Larsson & Moss, 1993)、ラットについて100本、ラビットについて34本の単一筋線維について検討した本実験では混在型筋線維は1本も検出されず、従来知見を支持する結果となった。

LC1fとLC3fの構造を比較すると、C末端側の141個のアミノ酸配列は同様であるが、LC1fにおけるN末端側46個とLC3fにおける8個の配列に違いがみられる (Frank & Weed, 1974)。また、鳥類と哺乳類とではLC1fのアミノ酸が部分的に異なるのは当然であるが、鳥類と哺乳類のLC1fにおい

てみられるアミノ酸の入れ替わりが同様にLC3fにも観察されることが報告されている (Matsuda et al., 1981)。これは、この2つのタンパクが同一の遺伝子からコードされ、スプライシングの過程において異なるmRNAが作られているためであると考えられている (Robert et al., 1982; Periasamy et al., 1983; Nabeshima et al., 1984)。

LC1fとLC3fの含有量が筋線維によって異なることは全筋のデータから推察されてきたが (Mabuchi et al., 1982; Pette et al., 1979)、すべてのタイプの単一筋線維について定量的に検討した報告はみられず、本研究が初めての試みである。表10および表11に示された結果は、HCIIBを多く含む筋ではHCIIAを多く含むものと比べLC3fの含有量が高いこと (Termin & Pette, 1991)、あるいは収縮活動量の増加によるHCの移行(HCIIB→HCIID→HCIIA)に伴いLC3f/LC1fが減少することなどを示す先行研究 (Bar, et al., 1989) とよく一致する。

筋線維の収縮速度は含まれるHCの種類に主として依存して決定されることが広く認められてきたが (Bottinelli et al., 1991; Reiser et al., 1985)、近年その作用機序はよく分からないものの、alkali LCは従来考えられていたよりも収縮速度の調節に深く関与していることを示唆する報告がなされている。例えば、Sweeney et al. (1988) はtype IIB/D 線維の収縮速度についてラビットの腰筋と前脛骨筋のものについて比較し、同じタイプの筋線維でありながら腰筋の方が速く、その違いはおそらくLC3f/LC1fの差異に起因しているであろうと結論している。さらに、Moss et al. (1990)は筋内のLC3fとfast HCの含有量を変化させた筋の収縮特性の検証

から、HCよりもLCの方が収縮速度に対して大きな影響力を持つことを示唆している。Lowey et al. (1993) の研究はさらに興味深く alkali LCを含まないミオシン上でのアクチンの移動速度は、alkali LCを含むミオシン上でのものの約1/3であることを示しており、これらはいずれもLCはmATPase活性に対しては機能を持たないとしても (Lowey, 1986)、クロスブリッジサイクルにおける化学エネルギーを機械的エネルギーに変換する過程でアクチンと何らかのかたちで作用し、収縮速度を調整していることを示唆する。単一筋線維の収縮速度が筋線維タイプ毎に明確なクラスターをつくらず連続的であるのは (Bottinelli et al., 1991)、HCとLCに非常に多くの組み合わせがあるからであろう (Staron & Pette, 1987)。このように幾つかの先行研究が示すように、HCとLCの両方が収縮速度に関与しているのであれば、このことは筋線維が収縮速度を変化させなければならない必然性におかれた場合、より詳細なステップでそれを成就することにつながると考えられる。

実験IIでは協同筋切除による残存の筋におけるLC3f/LC1fの減少は、HCIIBの減少が生じた後にみられることが示され、このこととLC3fの減少がタンパクレベルで起こっても、LC3fをコードするmRNAはタンパクで見られるほど減少しないとする報告 (Kirschbaum et al., 1989a) と合わせ、HCとLCとの間に特異的な親和関係があるであろうことが推察された。本研究の結果はこのような親和性の存在を直接証明はしないが、少なくともその可能性を示唆するものである。そして、表10および表11からLC3fとの親和性はラット骨格筋ではHCIIB > HCIID > HCIIAの順で、ラビット

ではラットほど明確ではないがHCIID > HCIIAの順で大きいと推測される。なお、ラビットの骨格筋ではHCIIBの含有量は少ないことが認められており (Aigner et al., 1993)、本実験においてもtype IIB 線維を剥離することができず、この線維のLCに対する親和性については今後の研究課題として残された。

5. 要 約

ラットおよびラビットの各タイプの単一筋線維におけるミオシン軽鎖(LC)の分布を検討する目的で、長指伸筋から単一筋線維を剥離し電気泳動によりミオシン重鎖(HC)およびLCを分画し、以下の結果を得た。

- 1) ラットおよびラビットの速筋単一筋線維ではfast type LCとslow type LCが混在したものは検出されなかった。
- 2) ラットでは、fast alkali LCに対するLC3fの比はtype IIB > type IID > type IIAの順で大きかった。
- 3) ラビットでは、fast alkali LCに対するLC3fの比はtype IIA 線維に比べtype IID 線維において高い傾向にあった。
- 4) 同一タイプの筋線維内においては、fast alkali LCに対するLC3fの比のレンジは大きく、異なるタイプの筋線維間ではか

なりの部分にオーバーラップがみられた。

これらの結果は、同タイプの単一筋線維において収縮特性が異なるのは、fast alkali LCの分布比率の違いに原因があるとする知見を支持するものである。また、収縮活動量の増加に伴うLC3fの減少はHCとLCの親和性と関連があるものと推察される。

VII. ラビット単一筋線維におけるアイソミオシンの分布 (実験IV)

1. 目的

近年、alkali LCが筋線維の収縮特性に対して、従来考えられてきたより大きな影響を及ぼすとする報告がなされ(Lowey et al., 1993; Bottinelli et al., 1993, 1994)、筋線維の機能的特性に関して生化学的な検討を加えようとする際、HCのみならずLCのアイソフォームの分布についても考慮することの重要性が強調されるようになった。

実験IIIにおいて齧歯類骨格筋では、LC3fの含有量はtype IIB > type IID > type IIA の順で高いことが認められた。しかしながら、実験IIIで用いたSDS-PAGEではSDSが強力な変性剤として作用し、HCとLCは分離し別々に泳動される。したがって、筋線維に含まれるHCあるいはLCの定量・定性的なデータを得ることはできるが、それらが生体の中でどのように結合し機能しているのかについては、明確な結論をくだすことはできない。特に、何らかの要因により細胞内においてミオシン分子の発現状態の変化が進行している筋線維では、HCと結合していないLCの存在が指摘されており(Kirschbaum et al., 1989a)、それらがSDS-PAGEの結果にどのように影響するのか明確ではない。したがって、SDS-PAGEのデータと非変性条件下においてミオシンを分離し得られたデータとを比較・検討する必要があると思われる。

イオン強度の低い溶液中ではミオシンはフィラメントを形成してし

まうため、非変性条件下でミオシンを分離することには困難が伴った。しかしながら、ATPやATPのアナログを含んでいればイオン強度が低い溶液中であってもミオシンはフィラメントを形成しないことが明らかになり (Brahms & Brezner, 1961)、非変性条件下でミオシンをHCとLCが分離していない分子のままの状態でも分離することが可能になった (Hoh, 1975)。

ATPのアナログの1つであるピロリン酸ナトリウムを用いたピロリン酸ゲル電気泳動法 (PPi-PAGE) は、ミオシンを非変性条件下で分離する方法の中で最も頻繁に使用されてきた方法である (Hoh & Yeoh, 1979; Marechal et al., 1984; d'Albis et al., 1986; Templeton et al., 1988; Fitzsimons et al., 1990)。齧歯類骨格筋では、PPi-PAGEによってfast type ミオシン (FM) に4種類のアイソミオシンが検出されることが知られているが、HCおよびLCのアイソフォームの数からは少なくとも9種類のアイソミオシンが存在すると考えられる (表4)。

Termin & Pette (1990, 1991)はPPi-PAGEに改良を加え、この問題について検討し、理論的に推測された9種類のアイソミオシンが検出可能なことを報告した。しかしながら、Termin & Petteがゲル上で同定したバンドは、筋線維組成の異なる全筋におけるHC組成との比較から結論したものであり、推測の域を出ない部分がある。

本実験では、PPi-PAGEを用い単一筋線維におけるアイソミオシンを検出し、実験IIIで得られたLCについてのデータと比較すること、ならびにfast type アイソミオシンのゲル上での挙動を詳細に検討すること

を目的とした。

2. 方法

A 実験動物および筋タンパクの抽出

実験にはWhite New Zealand系雄ラビットの腰筋 (PS)、長指伸筋 (EDL) および大内転筋 (AM) を用いた。摘出した筋束を液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷却し、分析まで -70°C で保存した。単一筋線維を剥離するために、これらの筋束を実験IIIで用いたものと同様の方法でフリーズドライした。

全筋はまず液体窒素中で粉碎しパウダー状にして8倍 (mass/vol.) の抽出液で抽出した。抽出液の組成は100 mM ピロリン酸ナトリウム、5 mM EGTA、5 mM 塩化マグネシウム、300 mM 塩化カリウム、5 mM ATP, pH 8.5であった (Dalla Libera et al., 1978; d'Albis et al., 1991)。筋パウダーの入った抽出液を氷中に置き約20分間攪拌した後、10,000 gで10分間遠心分離し、得られた上清を等量のグリセロールで希釈した。単一筋線維の抽出には超音波バス(Plainiview, N. Y., USA)を用いた。剥離した単一筋線維を15 μl の抽出液の中に入れ、約2時間超音波による抽出を行った。得られたホモジネイトのうち3 μl をHCの分画のために、残り12 μl をアイソミオシンの分画のために用いた。ホモジネイトについては、分析まで -20°C で保存した。

B ミオシン重鎖の分離

ミオシン重鎖を分離するために、実験IIIで述べたものと同様のチャンバーを用いてSDS-PAGEを行った。セパレイティングゲルの組成は、7.5% (mass/vol.) アクリルアミド、0.075% (mass/vol.) ビスアクリルアミド、375 mM トリス塩酸 (pH 8.6)、30% (vol./vol.) グリセロール、0.1% (mass/vol.) SDS、0.1% (vol./vol.) TEMED、0.02% (mass/vol.) 過硫酸アンモニウムであった。全筋からの抽出液はincubation medium (実験 II 参照) で50倍に、単一筋線維からのものは10 μ lのincubation mediumで希釈し、全筋については10 μ l、単一筋線維については13 μ l 全てを泳動に使用した。通電は180 Vで18時間、室温で行った。

C アイソミオシンの分離

緩衝液 (25 mM ピロリン酸ナトリウム、2 mM EGTA、0.02% (mass/vol.) ブロモフェノールブルー、50% (vol./vol.) グリセロール, pH 8.5) を用い、ホモジネイトを全筋については20倍に、単一筋線維についてはモノジネイト12 μ lに対して10 μ lを加え希釈し泳動に使用した。

泳動はスラブゲルシステム(Desaphor VA150, Desaga, Heidelberg, Germany) を用い、Cavaille et al. (1986) および Termin & Pette (1991) の方法を修正して行った。ゲル溶液は、26.7 mM ピロリン酸ナトリウム、15 mM タウリン、8% (vol./vol.) グリセロール、5 mM 塩化マグネシウム溶液をpH 8.35にあわせた後、アクリルアミド (最終濃度 4%, mass/vol.) とビスアクリルアミド (最終濃度 0.11%, mass/vol.)を加えることによって調整した。ランニングバッファーの組成は40 mM ピロ

リン酸ナトリウム、2 mM EGTA、3 mM 塩化マグネシウム、8% (vol./vol.) グリセロール、pH 8.5 であった。120 Vで30分間予備泳動を行った後、サンプルを負荷し120 Vで72時間通電を継続した。泳動中、ランニングバッファの温度は+3℃に保たれた。

D 染色および定量

ゲルにはOakley et al. (1980)の方法に従って銀染色が施された。また、アイソミオシンの定量には、バイオメトラゲルスキャニングシステム (Biometra, Gottingen, Germany) を用いた。

3. 結果

A 単一筋線維に発現しているミオシン重鎖

2種類以上のHCを含む筋線維が観察され (図16, 5-8)、それらの大部分がHCIIDとHCIIB、あるいはHCIIAとHCIIDを発現していた。また、1例ではあったが3種類 (HCIIA、HCIID、HCIIB)全てのfast type HCを発現しているものも検出された (図16, 7)。これらのHC混在型筋線維は実験の対象から除外した。したがって、以下に述べる結果は1種類のHCを含んでいた筋線維のみについてである。なお、HCIIAを発現している筋線維はtype IIA 線維と、HCIIBを発現しているものはtype IIB 線維と、HCIIDを発現しているものはtype IID 線維と類別した。

B 全筋および単一筋線維におけるアイソミオシン

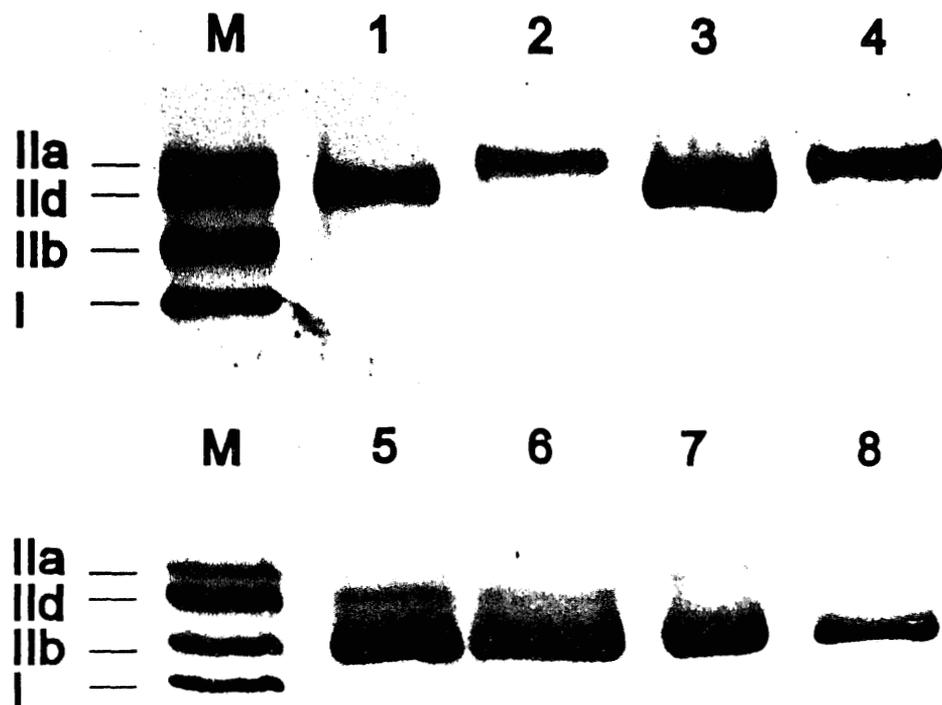


Fig. 16. Electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms in pure and hybrid single fibers of rabbit muscles. Abbreviations: I, slow heavy chain HCl; IIa, IIb, IIc, fast heavy chain isoforms.

ラビットの長指伸筋は多量のHClIDを、また、腰筋はHClIDのみを発現しており(Aigner et al., 1993)、したがってこれらの筋のホモジネイトから分離されるアイソミオシンのトリプレットは、HClIDから構成されるFM (FMd) であると思われる(図17)。長指伸筋のFMdと腰筋のFMdを比べると、腰筋のものの方がわずかではあるが移動速度が速く、各々の筋からの単一筋線維について比較しても同様の結果が得られた。長指伸筋は少量のHClIおよびHClIIAを含んでおり、FMより移動速度が遅いトリプレットはslow myosin (SM)、またFM3dより若干移動速度が遅いバンドはFM3aであると考えられる(図17)。type IIB 線維に発現しているアイソミオシンのトリプレット (FM1-3b) はFMdのものより移動速度が速いことが認められた(図17)。type IIA 線維に含まれるアイソミオシンのトリプレット (FM1-3a) はFMdより移動速度が遅く、3種類のfast type アイソミオシン(FMa、FMb、FMd) の中では最も移動速度の遅いバンドであった(図18)。これらのことは、3種類の単一筋線維を同一のゲル上で泳動することによって一層明瞭に確認された(図19)。図20に各アイソミオシンのPPi-PAGEにおけるゲルのトップからの移動距離を、FM3aのものを1.000としてまとめた。

C 単一筋線維におけるアイソミオシンの分布

表12に単一筋線維におけるアイソミオシンの分布を示した。3種類全ての筋線維に共通した特徴は、最も多く発現していたものはFM2であったことであった。一方FM1とFM3の分布は筋線維タイプ毎に異な

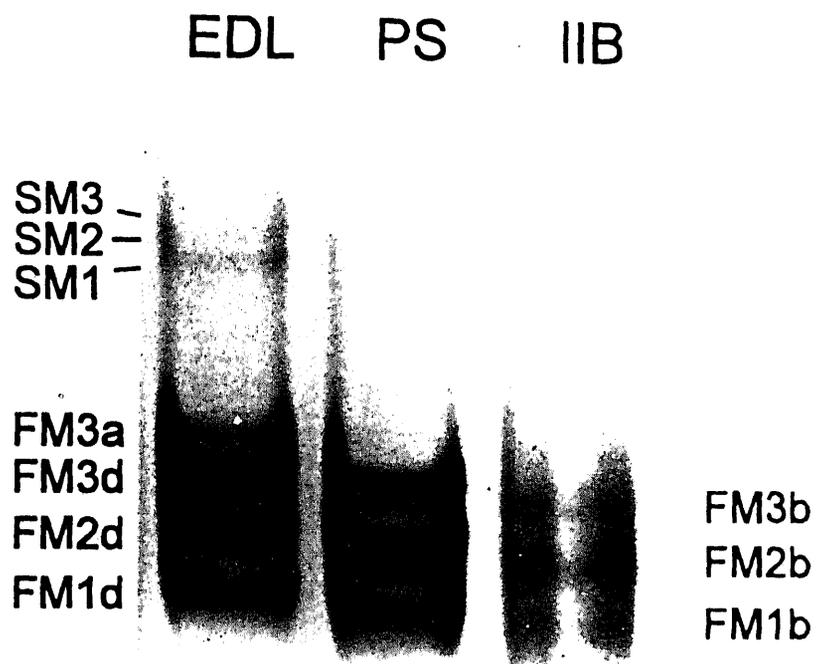


Fig. 17. Electrophoretic separation of isomyosin in extracts from extensor digitorum longus and psoas muscles, and of a single type IIB fiber. Abbreviations: EDL, extensor digitorum longus; PS, psoas; FM1-FM3, fast isomyosins; SM1-SM3, slow isomyosins.

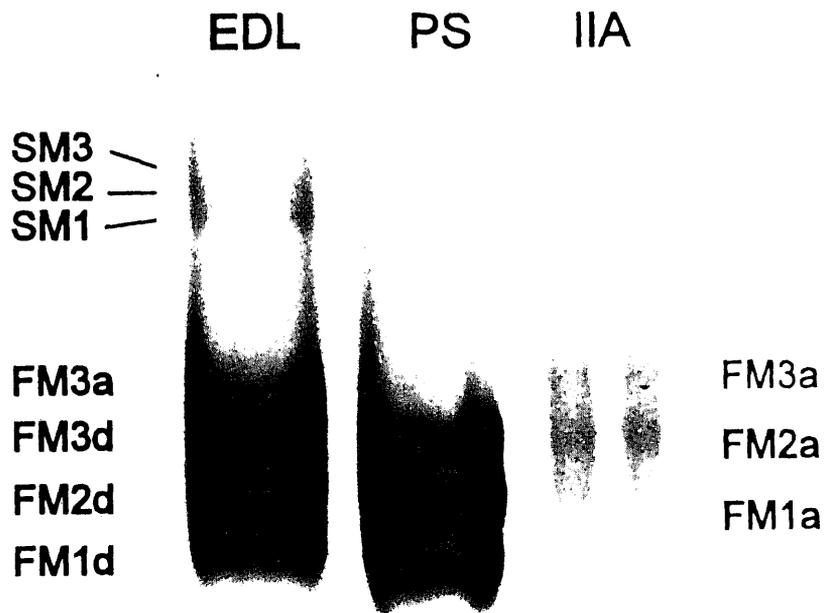


Fig. 18. Electrophoretic separation of isomyosin in extracts from extensor digitorum longus and psoas muscles, and of a single type IIA fiber. Abbreviations, see Fig. 17.

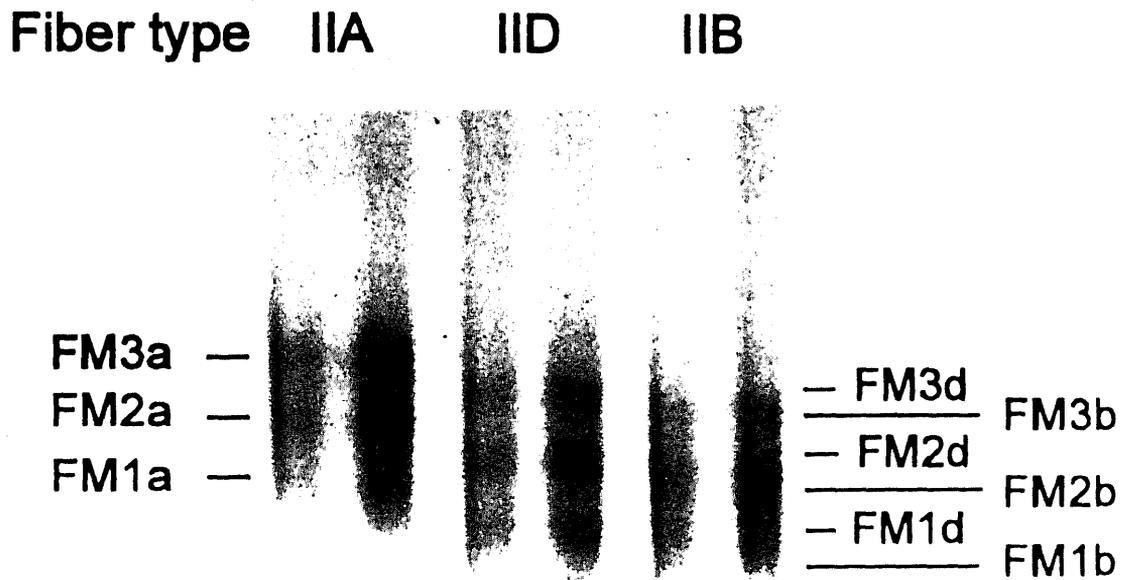


Fig. 19. Electrophoretic separation of isomyosins in single type IIA, type IIB, and type IID fibers. Abbreviations, see Fig. 17.

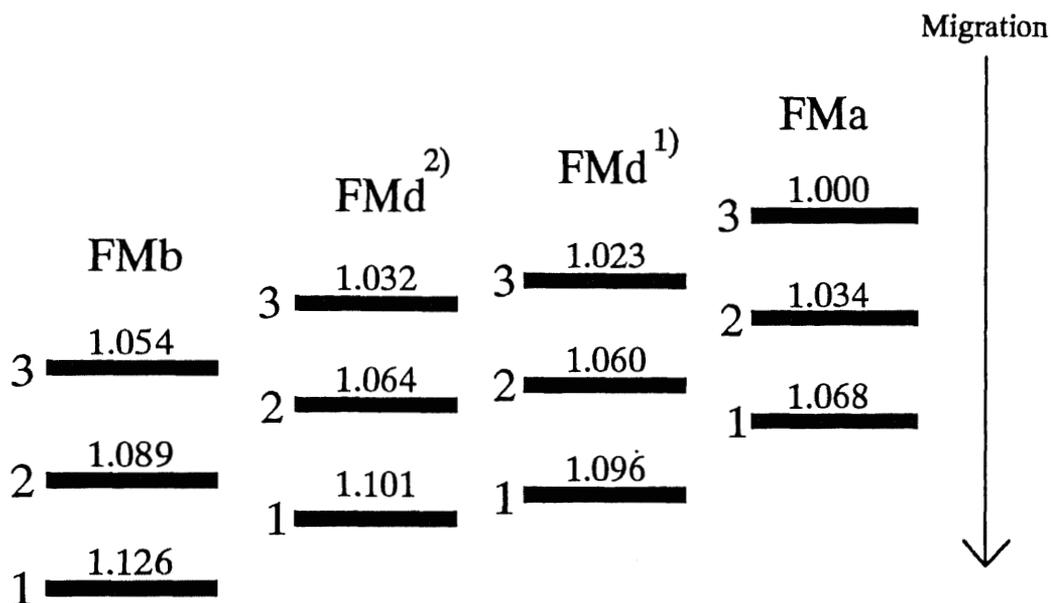


Fig. 20. Electrophoretic mobilities of fast isomyosin triplets on gel. FMd¹⁾ and FMd²⁾ are HClID-based isomyosin contained in extensor digitorum longus muscle and in psoas muscle, respectively. Values on the band indicate a migrating distance from the top of gel. Data are given as ratio of each isomyosin versus FM3a.

Table 12. Percentage distribution of FM1, FM2, and FM3 isomyosins in pure type IIA, IID, IIB fibers of the rabbit as determined by densitometric evaluation of silver-stained electrophoreses.

Fiber type	N	FM3 %	FM2 %	FM1 %	FM1/FM3
IIA	5	36.4 ± 2.9	42.1 ± 6.1	21.5 ± 4.0	0.58 ± 0.10
IID	38	29.8 ± 4.1	46.8 ± 4.6	23.4 ± 2.9	0.80 ± 0.18
IIB	11	30.5 ± 4.4	40.2 ± 1.1	29.3 ± 4.4	1.00 ± 0.28

Values are means ± SD

り、FM1/FM3の比は、type IIB > type IID > type IIA の順で高いことが認められた。

表12にみられるように単一筋線維に分布する各アイソミオシンの標準偏差は大きく、1つの筋線維内ではレンジが大きい傾向にあった。図21はtype IID 線維におけるFM3の分布のヒストグラムであり、このことを明確に特徴づける結果が示された。

4. 考 察

FM1には2分子のLC3fが、FM2には1分子のLC1fと1分子のLC3fが、FM3には2分子のLC1fが結合しており、この3つのアイソミオシン間でPPi-PAGEにおける移動度が異なるのは、このalkali LCの組成の違いに成因がある。さらに、FM1-3の各々にHCの組成が異なる3種類ずつのアイソミオシンがあるため、計9種類のfast type アイソミオシンが存在すると考えられている (Termin & Pette, 1990, 1991)。Termin & Pette (1991) は全筋の分析結果から、HCに基づくアイソフォームのトリプレットの移動度は、FMb > FMd > FMaの順で大きいと推測している。単一筋線維からアイソミオシンを分離した試みは本実験が初めてであり、図19に示される結果はTermin & Pette (1991) の推測を支持するものである。

Sweeney et al. (1988) は、ラビットにおいて腰筋のtype IIB/D 線維と前脛骨のtype IIB/D 線維とで最大収縮速度が異なることを、単一筋線維レベルの研究から認めている。腰筋、前脛骨筋ともにHCIIBは極

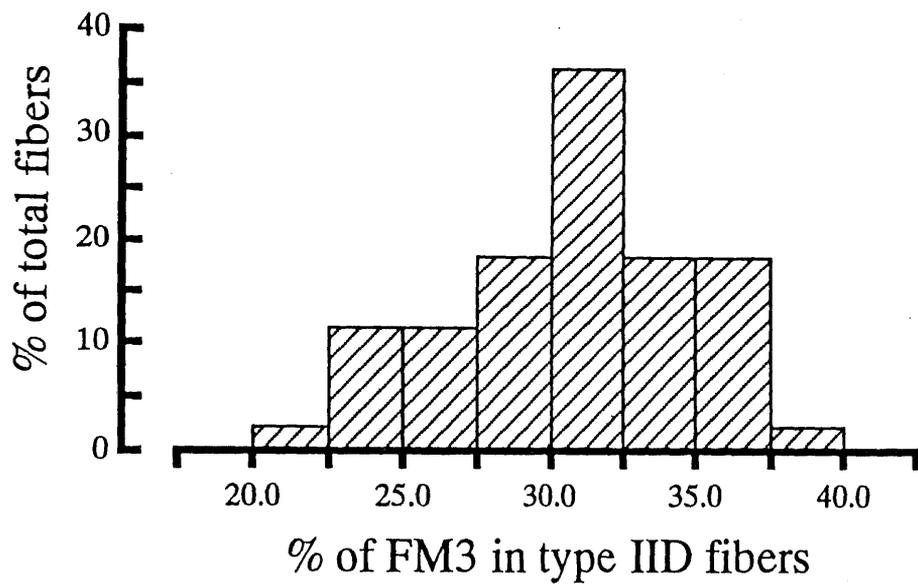


Fig. 21. Histogram of percentage distribution of FM3d in pure single type IID fibers of rabbit muscle.

わずか (約 1%) しか含まれておらず(Aigner et al., 1993)、彼らの示す結果がtype IIB 線維とtype IID 線維の差異を反映しているとは考えにくい。本実験では腰筋のFMdと長指伸筋のFMdとでPPi-PAGEにおける移動度が異なることが認められ、このことはSweeney et al. (1988)の知見とあわせ、HCかLCのいずれか一方、あるいは両方にこれまで検出されていない未知のアイソフォームが存在することを示唆し、今後さらに研究を進める必要がある。

Tsika et al. (1987) は全筋を対象とした分析結果に基づき、FM1は(LC3f)₂(LC2f)₂-HCIIBから、FM2は(LC1f)(LC3f)(LC2f)₂-HCIIBから、FM3は(LC1f)₂(LC2f)₂-HCIIBから、またIMは(LC1f)(LC1s)(LC2f)₂-HCIIAから構成されていると結論している。これはtype IIA 線維にはLC3fが結合しているアイソミオシンが存在しないことを示すものであるが、これとは対照的に実験 III ではtype IIA 線維にもLC3fが発現していることが、また本実験ではFM1aが検出され (図18, 19)、LC3fはHCIIAと結合しているであろうことが認められた。このように本研究では、全てのタイプの速筋線維において3種類のアイソフォーム(FM1-3) が発現していることが観察されたが、これらが1つのサルコメア内は同一のアイソミオシンで構成されているが、サルコメア毎で異なるのか、筋原線維毎に異なるのか、あるいは全くランダムに配列されているのかについては、現在のところよく分かっていない。

アイソミオシンのmATPase活性についてThomason et al. (1986) はFM1 > FM2 > FM3 の順で高いことを示唆している。しかしながら、こ

の研究で用いられたPPi-PAGEの解析能は低く、図20の結果からは彼らの示すFM1はFM1b、FM2b、FM2dおよびFM1aの一部を、FM2はFM3b、FM2d、FM3dの一部およびFM2aを、FM3はFM3dの一部およびFM3aを含んでいる可能性が高い。したがって、LCがmATPaseに対して機能を持たないとする知見とあわせ、Thomason et al. (1986) がアイソミオシンのmATPase活性に関して得た結果は、alkali LCではなく、含まれるHCのアイソフォームの量的な差異に起因しているものと考えられる。

表12および図21に示すデータは、実験IIIで得られた単一筋線維におけるLCの結果と極めてよく一致し、type IIA 線維においてはtype IIBあるいはtype IID 線維に比べて発現しているLC3fが少ないこと、また同一の筋線維タイプ内ではLC1fとLC3fの分布は偏差が大きいことを示す。これらのことから、少なくとも本実験で用いた筋では正常な状態ならば、SDS-PAGEから知りえるLCの定量的データは、細胞内で機能しているLCをよく反映していると結論されるとともに、逆にアイソミオシンの分析からLCに関する定量的データも得ることが可能であることが示唆された。

5. 要 約

ピロリン酸ゲル電気泳動 (PPi-PAGE) におけるfast type アイソミオシンを正確に同定すること、およびドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) から得られたミオシン軽鎖 (LC) に関する定量的

データが、生体内で機能しているものを反映しているかを検討することを目的として、単一筋線維に発現しているアイソミオシンを分画し、以下の結果を得た。

- 1) 全てのタイプの速筋線維において、FM1、FM2、FM3を発現していることが観察された。
- 2) PPI-PAGEにおける移動速度は、FMb > FMd > FMaの順で高いことが認められた。
- 3) 長指伸筋のFMdと比べ腰筋のFMdの方が、ゲル上における移動速度が速いことが示された。
- 4) FM1/FM3の比は、type IIB > type IID > type IIAの順で高いことが認められた。
- 5) 同一筋線維タイプ内におけるFM1およびFM3の分布には、比較的大きな偏差があることが認められた。

以上のことから、PPI-PAGEにより分画される9種類のfast type アイソミオシンが正確に同定されるとともに、SDS-PAGEから得られるLCについての定量的な結果は、少なくとも正常な速筋では細胞内で機能

しているものを反映していることが示唆された。

VIII. ヒト骨格筋におけるミオシン重鎖と軽鎖の親和性 (実験V)

1. 目的

実験IIIおよびIVにおいてラットおよびラビットの骨格筋ではHCとLCの間に特異的な親和性が存在するであろうことが認められた。これは活動量の増加した筋において合成速度が大きく減少していないにもかかわらず、LC3fのタンパク量が減少するのは、LC3fと親和性の高いHCIIBの量がLC3fに先行して低減するため、HCと結合していないLC3fが増加し、これらがHCと結合しているものと比べ速やかに分解されることに原因があるとする仮説 (Bar & Pette, 1989; Kirschbaum et al., 1989) を支持する結果であるといえる。

ラットとラビットを比較すると、組織化学的なmATPaseの酸に対する活性の低減の程度 (Matoba et al., 1985; Hamalainen & Pette, 1993)、あるいは電気刺激に対するHC、LCおよび酸化・解糖系各種酵素活性の変化 (Staron, et al., 1987; Simoneau & Pette, 1988; Termin, et al., 1989a)などに差異があることが明らかになっている。さらに、LC1saに関してラットよりラビットの方が等電点が酸性側に位置しているのに加え、ヒラメ筋におけるその発現量はラットよりラビットにおいて約10倍高いことが知られており (Termin & Pette, 1991)、これらはいずれも同じ齧歯類であっても、いわゆる種による違いが存在することを示すものである。

したがって、実験IIIおよびIVにおいてラットおよびラビットの骨格筋では、type IIB 線維においてtype IIA 線維と比べLC3fを多く発現していることが認められたが、この事実に基づきヒトの骨格筋線維におけるLCの分布について類推することには危険が伴うと思われる。そこで本実験では、バイオプシー法によって採取されたヒト骨格筋におけるLCの分布と筋線維構成比を検討し、HCとLCの関係についての知見を得ることを目的とした。

2. 方法

A 被検者および筋の採取

実験には22才～27才の健康な男子6名を用い、ニードルバイオプシー法により外側広筋より筋を採取した (Bergstrom, 1962)。それらを2つに分け一方をLCの分析に、もう一方を組織化学的分析に使用した。組織化学的分析に使用する筋を採取後直ちにコンパウンドで包埋、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷凍した。LCの分析に用いるサンプルについては、分析まで液体窒素中で保存した。なお、被検者にはあらかじめ実験の目的とそれに伴う危険性について説明し、バイオプシーを行うことについて同意を得た。

B 組織化学的分析

-25℃にセットしたクリオスタット中で厚さ約10 μ mの連続横断切片を作成、カバーガラスにマウントし、室温で乾燥後、組織化学的染色を施し

た。mATPaseはMatoba & Gollnick (1984) の方法に従って行い、preincubationにおけるpHは10.3、4.6、4.3の3種類、浸漬時間はそれぞれ10分 (37℃)、4分 (25℃)、5分 (25℃)であり、このコンディションは予備実験の結果から決定した。preincubation終了後、0.1 M 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMpro)、18 mM 塩化カルシウム、50 mM 塩化カリウム、pH 9.4 から成る緩衝液で切片を洗浄し、続いてincubationを行った。incubation溶液の組成は、0.1 M AMpro、18 mM 塩化カルシウム、50 mM 塩化カリウム、3.1 mM ATP、pH 9.4 であり、37℃で30分間incubationは行われた。また、連続切片にはNachlas et al. (1958)の方法に従ってNADH-TR染色も施された。得られた標本からBrooke & Kaiser (Brooke & Kaiser, 1970a, b)の分類法に基づき、各筋線維をアルカリpreincubationでほとんど反応を示さず、酸preincubationで強い反応を示すものをtype I 線維、type I 線維と全く逆の反応を呈するものをtype IIA 線維、pH 10.3と4.3のpreincubationに対してはtype IIA 線維と同様の反応を示すが、4.6ではtype IIA 線維とtype I線維の中間の反応を呈する線維をtype IIB/D 線維、全てのpHで反応を示すものをtype IIC 線維と同定した。NADH-TR染色が施された切片をプロジェクターに投影、各筋線維をトレースし、それらからデジタイザーを用いて筋線維横断面積を算出した。

C 電気泳動

実験 I で述べたものと同様の方法で筋タンパクの抽出を行い、マクロ二次元電気泳動法 (Hirabayashi, 1981) によりLCを分離した。ゲルにはクー

マシーブリリアントブルー染色を施した。LCの定量の方法も実験 I で述べたものと同様であった。

D ミオシン軽鎖の相対的分布比率の算出

ラットの場合とは異なり、ヒト骨格筋のLC1fとLC1sは等電点および分子量ともに類似しており、本実験で用いた泳動法では両者は1つのスポットとして挙動した (図22)。そこで、(LC1f+LC3f) : LC1s = LC2f : LC2s と仮定し、以下の(1)および(2)の式に基づきLC1fとLC1sの量を算出した。なお、LCのアイソフォームの分子量としては、Billeter et al. (1981)によって報告されたものを用いた。

$$\frac{LC1f+LC3f}{LC1s} = \frac{LC2f}{LC2s} \quad \text{—————} \quad (1)$$

$$LC1f \times 23000 + LC1s \times 24000 = LC1a \quad \text{—————} \quad (2)$$

LC1f, LC2f, LC3f, LC1s, LC2s : デンシトメトリーにより得られたそれぞれの相対量を分子量で割った値

LC1a : LC1のスポットの相対量

23000 : LC1fの分子量

24000 : LC1sの分子量

3. 結 果

A 二次元電気泳動パターン

図22にヒト骨格筋の二次元電気泳動パターンを示した。齧歯類骨格筋の分離パターンと同様に、 α トロポミオシンおよびトロポニンCにはfastとslowのアイソフォームが分画されたが、前述のようにLC1sとLC1fについては明確に分離することはできなかった。

B 筋線維組成およびミオシン軽鎖の分布

筋に占めるtype I 線維の面積比 (% type I fiber area) のレンジは31.2-65.0 %、また% type IIB/D fiber areaのレンジは9.4-30.4 %であり、本実験で用いた被検者の筋線維組成は比較的幅の広いものであった(表13)。また、% type IIC fiber areaは平均で0.9 %、最も多い被検者で2.1 %であった。

LCでは最も多く分布していたアイソフォームはLC2fであり、平均値で33.5%であった。LC3fは5つのアイソフォームの中ではその量が最も少ないアイソフォームであったが、レンジは大きく最も多い被検者の値は最も少ない者の約7.7倍であった。

C 筋線維組成とミオシン軽鎖のアイソフォームの関係

図23は% type I fiber areaとslow type LC (LC1sおよびLC2s) の割合との関係を示したものである。両者の間には有意な正の相関関係が認められ、その回帰式は $Y=0.63X+10.26$ ($r=0.92$, $P<0.01$)であり、この直線は $Y=X$ よ

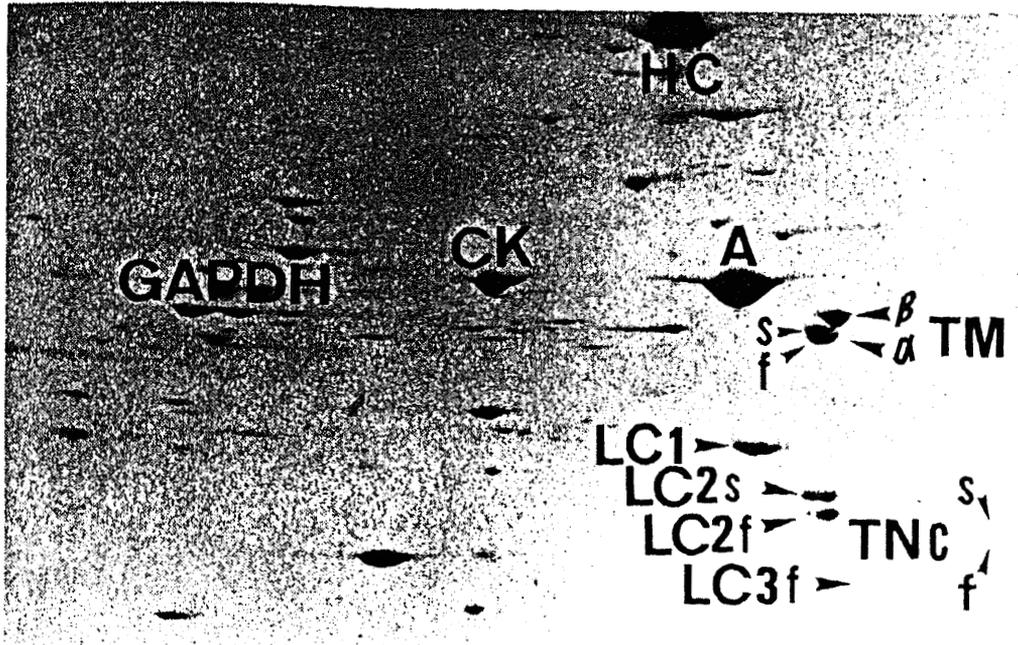


Fig. 22. Two-dimensional electrophoresis of human skeletal muscle with 53.0% type I fiber area. Abbreviations: HC, myosin heavy chain; A, actin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CK, creatine kinase; TM, tropomyosin; TNC, troponin C; LC, myosin light chain; f, fast; s, slow.

Table 13. Mean (\pm SD) and range for percentage of fiber type area and the molar ratio of myosin light chain (LC) isoforms in human vastus lateralis muscle.

	Parameter	
	Mean \pm SD (%)	Range (%)
% Fiber type area		
I	47.0 \pm 12.0	31.2 – 65.0
IIA	32.1 \pm 7.5	24.1 – 41.0
IIB/D	20.0 \pm 9.3	9.4 – 30.4
IIC	0.9 \pm 0.8	0 – 2.1
Molar ratio of LC		
LC1f	16.6 \pm 4.6	10.7 – 24.2
LC1s	17.5 \pm 2.9	14.6 – 23.1
LC2f	33.5 \pm 3.8	26.3 – 37.7
LC2s	22.4 \pm 5.8	16.7 – 30.9
LC3f	10.0 \pm 6.0	2.3 – 17.6

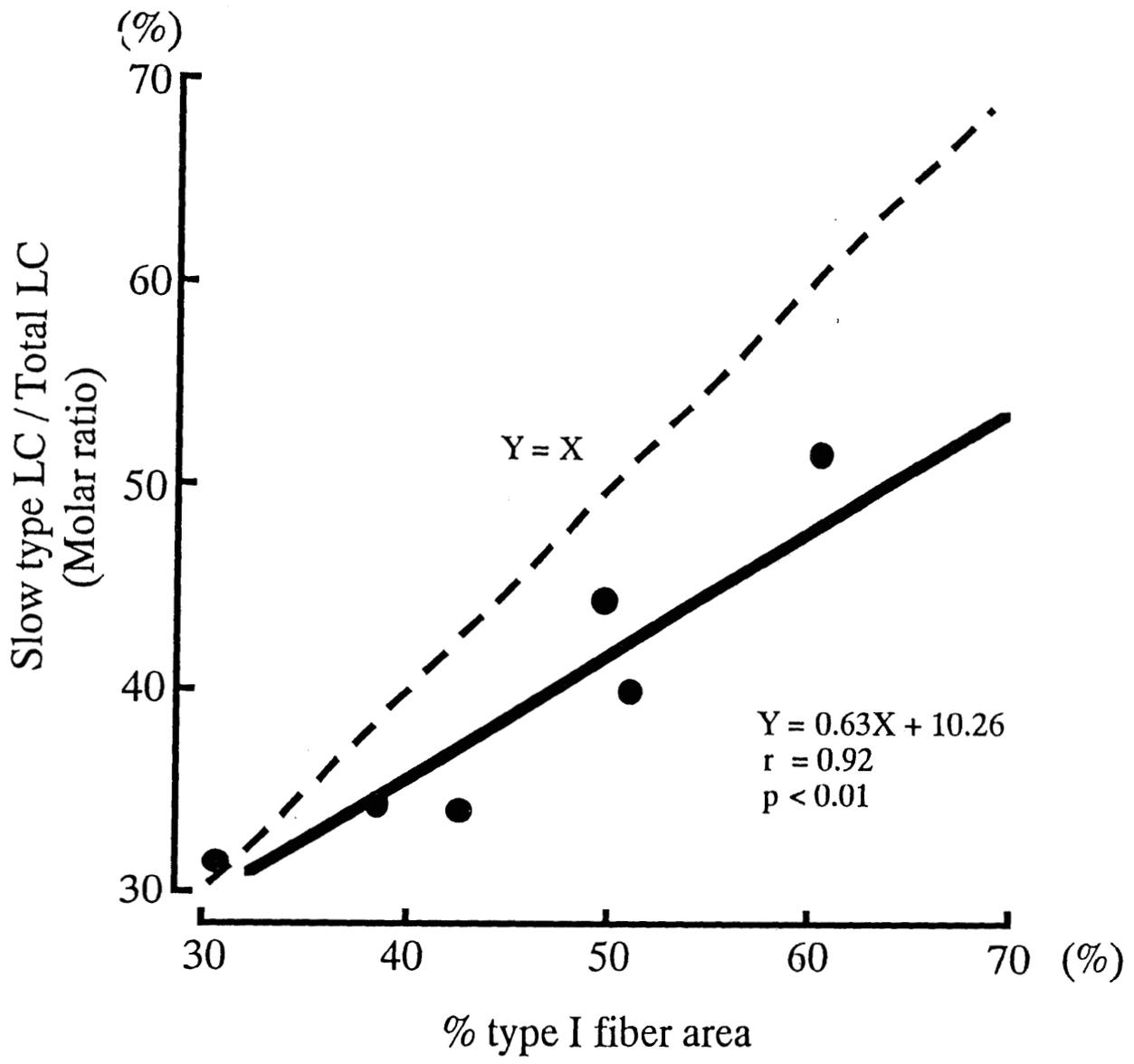


Fig. 23. The relationship between the percentage of type I fiber area and the molar ratio of slow myosin light chain (LC1s and LC2s) to total myosin light chain. A broken line is the line of unity.

り下方に位置した。また、% type II fiber areaに対する% type IIA fiber areaの比とfast alkali LC(LC1fおよびLC3f)に対するLC1fの比との間にも有意な正の相関関係が示され、その回帰式は $Y=1.22X+13.22$ (図24; $r=0.83$, $P < 0.05$)であった。

4. 考 察

筋線維における酸あるいはアルカリに対する組織化学的なATPaseの活性の変化については、Brooke & Kaiser (Brooke & Kaiser, 1970) が詳細に検討した結果、ヒトを含む多くの哺乳類ではこの反応応答から少なくとも3種類に筋線維を分類できることを観察し、それらを type I、type IIA、type IIB 線維と呼んだ。このATPaseの反応に対しては、ミトコンドリアのATPaseは全く反応していないこと、あるいは筋小胞体に含まれるATPaseの関与率は5%以下であることが示されており、これらのことからこの染色応答が筋原線維のATPase (mATPase) の特性をよく反映していると考えられている (Mabuchi & Sreter, 1980)。このmATPaseの反応が、HCかLCのどちらの特性に依存しているのか、あるいは両者の相互作用によって左右されるのかは明確ではなかったが、Staron & Pette (Staron & Pette, 1986, 1987a, b) がmATPaseによってタイプ分けされた単一筋線維に含まれるLCおよびHCのアイソフォームの種類を調べ、発現しているHCのみが組織化学的な筋線維のタイプを決定することを明らかにした。齧歯類骨格筋ではtype I、IIA、IIB 線維に対応するHCI、HCIIA、HCIIIB

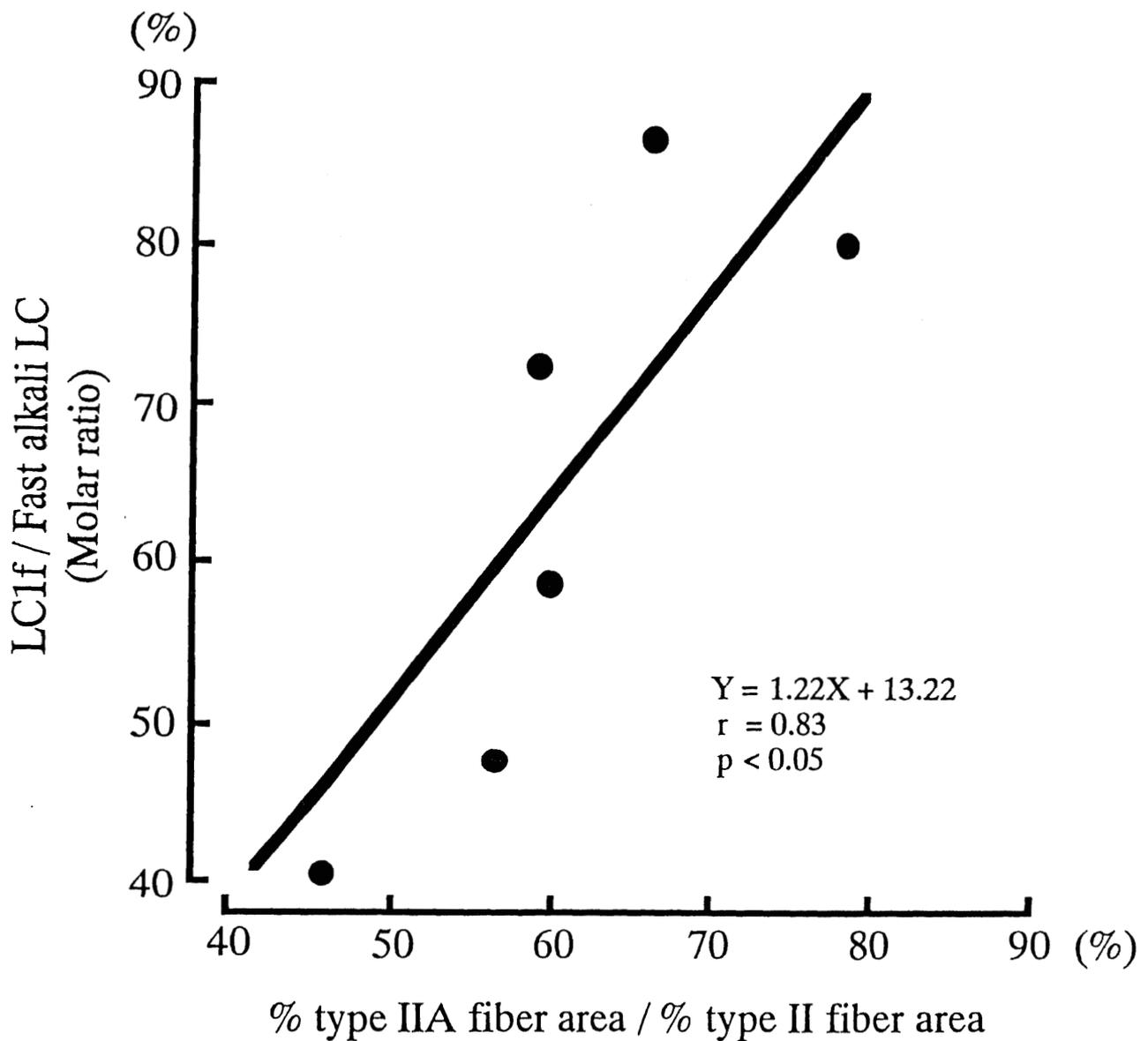


Fig. 24. The relationship between the ratio of percentage of type II A fiber area to that of type II fiber area and the molar ratio of LC1f to fast alkali light chain (LC1f and LC3f).

に加え、組織化学的にはtype IIB 線維と同様の染色反応を呈する筋線維の中に、HCIIBとは異なるアイソフォームを含むものが存在することが示されており、この第3の fast type HC はHCIIDあるいはHCIIXと呼ばれるようになった (Schiaffino et al., 1986; Bar & Pette, 1988; Aigner et al., 1993; Hamalainen & Pette, 1993)。ヒトの骨格筋では、現在のところ第3のfast type HCのアイソフォームが検出されたという報告はなされていないが、Sant'Ana Pereira & Moorman (1994)によるとヒト骨格筋のtype IIB/D 線維は免疫組織化学的には齧歯類のtype IID 線維と酷似した染色反応を示すとされ、ヒトのtype IIB/D 線維に含まれるHCは構造的に齧歯類のHCIIDに類似している可能性が高い。しかしながら、type I、type IIA、type IIB/D 線維に対応する3種類のみHCのアイソフォームが存在することに変わりはなく (Biral et al., 1988)、したがって、本実験で示す各筋線維の面積比は筋に占める3種類のHCの割合をほぼ正確に示すものとみなすことができる。

Staron & Pette (1987a, b) による単一筋線維についての組織化学的・電気泳動学的分析は、ラビット前脛骨筋ではslow typeとfast typeの両方のLCを発現している混在型type IIA 線維はなかったが、ヒラメ筋では存在していたことを示している。また、ヒラメ筋における混在型type IIA 線維は、ラットにおいてもみられること (Sugiura et al., 1992b)、あるいはtype IIA 線維から移行してきたと思われるtype I 線維は、slow type LCに加えLC1fを発現していることなども報告されている (Staron et al., 1987)。一方、ヒト骨格筋に関する報告では、Billeter et al. (1981)によっ

ではtype IIA 線維には混在型はないが、type I 線維には存在することが、それに対してLarsson & Moss (1993) によってはtype I、IIA、IIB 線維のいずれも約50%が混在型であることが認められている。もし、type I 線維がslow type LCのみを、type II 線維がfast type LCのみを発現しているならば、図23に示される回帰直線は $Y = X$ の近くに位置するはずであるが、実際はそれよりも下方に認められ、これはtype I 線維にのみ混在型が存在するとするBilleter et al. (1981) の知見と一致する結果である。

ヒラメ筋に代表される遅筋ではLC3fをコードするmRNA (LC3f-mRNA) は蓄積しているが、それに相当する量のタンパクは発現しておらず (Barton et al., 1985)、転写後に何らかの制御機構が存在することが示唆されている。実験 I および II において活動量が増加した速筋ではLC3fが減少することが示されたが、このようなLC3fのタンパクの減少量はLC3f-mRNAの減少量を上回ることが明らかになっており、遅筋における転写後の制御機構が速筋においても存在することが考えられる。この制御機構の1つとしてはリボゾームにおける翻訳効率の変化が考えられるが、LC3fのタンパクの減少量と合成量の減少とを比較すると、タンパク量の減少が上回り (Bar et al., 1989)、このことから翻訳効率の変化よりもタンパクの分解の亢進が、LC3f減少の原因であると思われる。

先行研究 (Kirschbaum et al., 1989a; Termin et al., 1989; Kirschbaum et al., 1990; Termin & Pette, 1992) と一致して、実験 II では収縮活動量増大に伴うHCIIBの減少はLC3fの減少に先行して起こることが認められ、Bar & Pette (1989) およびKirschbaum et al. (1989a) はこれがLC3fの分解

を促進する要因ではないかと推測している。すなわち、LC3fのHCアイソフォームに対する親和性は他のものと比べHCIIBと最も高く、HCIIBがLC3fに先行して低減するため、HCと結合していないLC3fが増加し、これらがHCと結合しているものと比べ速やかに分解されるのではないかというのである。

本研究では% type IIA fiber area / % type II fiber とLC1f / fast alkali LCの間に正の相関関係が存在することが観察され (図24)、type IIB/D 線維に比べtype IIA 線維においてLC1fが、逆にtype IIB/D 線維ではLC3fが多く発現していることが示された。このことがLCとHCとの間の特異的な親和性の存在を直接示すわけではないが、少なくともその可能性があることは示唆される。持続的な運動によるLC3fの減少およびLC1fの増加が、ヒトにおいても起こるかどうかについて検討した報告は現在のところなされていない。しかしながら、仮にそれが生じるとすれば、前述のBar & Pette (1989) およびKirschbaum et al. (1989a) がラットの筋において類推したものと同様の作用機序によって、初期のLC3fの減少が起こることは十分考えられる。

5. 要 約

ヒト骨格筋におけるミオシン軽鎖 (LC) の分布について検討する目的で、ニードルバイオプシー法により外側広筋よりサンプルを採取し、それらに組織化学的および電気泳動学的分析を施し、以下の結果を得た。

- 1) 筋に占めるtype I 線維の面積比 (% type I area; X) とslow type LC (LC1sおよびLC2s)の割合(Y)との間に有意な正の相関関係が認められた。この回帰直線は $Y = X$ のラインより下方に位置した。

- 2) %type II areaに対する%type IIA areaの比とfast alkali LC (LC1fおよびLC3f)に対するLC1fの比の間に有意な正の相関関係が認められた。

これらの結果から、ヒトの骨格筋ではtype I 線維の幾つかはslow type LCに加えfast type LCを発現していることが示唆されるとともに、type IIA 線維はLC1fを、それに対してtype IIB/D 線維はLC3fを多く発現しており、ミオシン重鎖(HC)とLCの間に特異的な親和性が存在すると推察される。

IX. 討 論

1972年にGollnick et al. (1972) は運動選手の筋の特性について報告したが、彼らの研究がスポーツ科学はもとより、その後の生理・生化学おける発展の喚起に寄与した部分は大きい。それは、ニードルバイオプシー法をこの分野の研究に導入し、それまで動物実験から観察された結果からヒトの体内でも起こっているであろうことを類推するしかなかったものが、直接的なデータとして得ることが可能になったからである。Gollnick et al. (1972) が提示した最も重要な知見は、運動選手の筋でみられるtype I 線維とtype II 線維の割合がスポーツ種目毎に特徴的な値を示すことである。このことについて彼らは、明言はしていないがもともとそのような筋線維組成を持った者が適切な種目を選択したのでであろうとし、先天的な要因によるところの重要性を示唆している。その後これを裏付ける多くの知見が示されてきた (Andersen & Henriksson, 1977; Komi et al., 1977; 勝田ら, 1984, 1985)。

しかしながら、電気刺激、協同筋の切除あるいは交叉神経支配などの方法によって(Pette et al., 1976; Baldwin et al., 1982; Brown et al., 1983; Noble et al., 1983; Leberer et al., 1987)、速筋において収縮活動量を顕著に増加させると、slow type ミオシンの増加、単収縮におけるtime to peakの遅延、あるいは筋小胞体のCa²⁺取り込み能力の減少など、fastからslowへの移行を示唆する変化が筋にみられることが認められている。これらのことから、type II 線維が十分動員されうる強度で長時間トレーニング

グを継続することができるならば、電気刺激に代表されるような非生理学的な方法をとらなくても、type II 線維からtype I 線維へのタイプ移行を起こすことが可能であると考えられる。

実験 I ではこのような仮説に基づき、1日4時間にもおよぶ走行トレーニングをラットに負荷したところ、ヒラメ筋においてtype I 線維の増加が観察され(表7)、トレーニングによるtype II 線維からtype I 線維への移行が現実に行き起こることが示唆された。ヒトにおいても同様のタイプ移行が行き起こるのかどうか、また、もし起こるとすればどのような強度の運動をどの程度の期間行えばよいのかについては、明らかになっていない。ヒトに1日18.5マイルのクロスカンリースキーを週6日の頻度で8週間行わせ、上腕三頭筋の筋線維組成を調べた例では(Schantz et al., 1982)、type II 線維の減少およびfast とslowの両方のミオシンを発現しているtype IIC 線維の増加は認められたものの、type I 線維の増加は観察されていない。毛細血管の増殖や酸化系酵素活性の増大が電気刺激開始後1週間以内で生じるのに対し、ミオシンタンパクの変化は長期間を要することからも明らかのように(Pette, 1986)、type II 線維とtype I 線維間の移行が進行するのに必要な刺激閾値は相対的に高いと考えられ、ヒトを対象にした実験では方法的にタイプ移行の成因となりえるほどの強度と期間を伴ったトレーニングを負荷することに困難が伴うことは容易に想像できる。ヒト骨格筋におけるトレーニングとタイプ移行の関係についての明確な解は、何十年といったスパンの縦断的な研究を行って初めて得られるものと思われる。

type II 線維からtype I 線維への移行と比べ、type II 線維のサブグルー

プ内でのタイプ移行は比較的容易に起こり、この変化は持久トレーニングのみならず(Andersen & Henriksson, 1977)、ウェイトトレーニングによっても生じ(Staron et al., 1991)、収縮の様式とは関連せず活動量の増大に起因して引き起こされると考えられる。これまでの組織化学的手法による検討は、活動量の増大に伴ってtype IIB/D → type IIA への移行が起こることを明らかにしてきたが (Andersen & Henriksson, 1977; Staron et al., 1987)、HCに着目した報告ではtype IIB/D 線維内ではtype IIB → type IID への移行も進行していることを認めている (Termin et al., 1989a)。実験 II の結果はこれを支持するとともに、type IID → type IIA と比べtype IIB → type IID の移行の方が早期に生じることを示唆する(図11)。さらに、HCだけではなくLCの経時的変化も併せて検討したところ、type IIB → type IID の移行はLC3fの減少にも先行して起こることが認められた(図12)。

LCはmATPaseには関与しないばかりか (Sivaramakrishnan & Burke, 1982; Lowey, 1986)、初期には収縮特性にも役割を果たしていないと考えられてきたため (Barsotti & Butler, 1984)、種々の要因に伴うLCの変化は幾つかの研究において検討はされてきたが、それが機能的にどのような影響を及ぼすのかは全く分からなかった。しかしながら、LCについての最近の報告は、以前考えられてきたよりはるかに深く収縮特性に関与することを示している。それらの中でもLowey et al. (1993) の示す知見は特に興味深く、alkali LCを含むミオシン上でのアクチンの移動速度は、含まないミオシン上でのものの約3倍だという。さらに、Bottinelli et al. (1993, 1994) および Sweeney et al. (1988) は、alkali LCの中でもLC3fを多く含

む筋線維ほどVmaxが高いことを報告しており、彼らがいうようにHCに加えLCも収縮特性に関与するのであれば、実験 II で観察されたfast type HCのアイソフォームの変化 (図11) およびLC3f/LC1fの比の減少は (図12)、単に速筋線維において収縮速度が低減したことを示すだけでなく、その低減がより詳細なステップで起こることを示唆する。LC1fとLC3fは同一の遺伝子からコードされ、スプライシングの段階で異なるmRNAとなり、各々のタンパクが作られることが認められているが (Robert et al., 1982; Periasamy et al., 1983; Nabeshima et al., 1984)、これらが収縮に際してどのようにアクチンに作用するのかについての詳細は明らかになっていない。

ヒラメ筋ではLCをコードするmRNAは筋内に存在しているがそれに相当する量のタンパクは発現していないこと (Barton et al., 1985)、あるいは収縮活動量の増大に伴うLC3fの減少量は、このタンパクの合成量の減少を上回ること (Bar et al., 1989) などからは、ある特定の条件下ではLC3fの分解が亢進することを示唆される。その特定の条件を生み出す要因としてLCとHCとの間に存在するであろう特異的な親和性があげられている。すなわち、LC3fの親和性はHCIIAよりHCIIBに対して高く、発現しているHCIIBが全く無いか、あるいは少ない筋線維ではLC3fがmRNAから翻訳されてもHCと結合しないものが多く、それらが速やかに分解されてしまうというのである (Bar & Pette, 1989; Kirschbaum et al., 1989a)。このようなHCとLCの親和性の有無について、直接それを明示する知見は現在まで得られていないが、仮にそれが存在するならば、少なくともtype IIB 線維にはLC3fが、それに対してtype IIA 線維にはLC1fが多く発現していなけ

ればならない。筋線維に含まれる fast alkali LCの分布に関しては、先行研究 (Termin & Pette, 1991) では全筋における分析結果から推測はされてきたものの確証は得られていない。実験 III および IV における単一筋線維のLC、アイソミオシンについての定量的データは、ラットおよびラビットの骨格筋では分布するLC3fの量は、type IIB > type IID > type IIAの順で高いことを明示するものである。

単一筋線維のVmaxはLC3fの含有量と同様に平均値では、type IIB > type IID > type IIAの順で高いが、各々の筋線維内では偏差が大きいことが認められている (Bottinelli et al., 1991)。このことについて Bottinelli et al. (1991) は、fast alkali LCの分布が同一タイプの筋線維であっても筋線維毎に異なることに原因があるのではないかと推測しており、図15はこれを支持する結果である。

同じ齧歯類であってもラットとラビットでは、骨格筋における種々の特性やそれらの変化の様相に種による違いがあることが明らかになっており (Matoba et al., 1985; Simoneau & Pette, 1988; Termin et al., 1989a)、したがって、実験 III および IV の結果からヒト骨格筋におけるLCの分布を類推することには危険が伴うと思われる。そこで、実験 V ではヒト骨格筋について検討し、type IIA 線維ではtype IIB/D 線維と比べLC1fを、逆にtype IIB/D 線維ではLC3f を多く含んでいることが示された。ヒト骨格筋において、収縮活動量の増大に伴ってfast alkali LCの分布に変化が起こるかどうかについて検討した報告は現在までなされていない。しかしながら、仮にそれが起こるとすれば、Bar & Pette (1989) およびKirschbaum

(1989a)がラットの筋において類推したものと同様の作用機序によって、LC3fの減少が起こることは十分考えられる。

X. 総括

本研究では、筋線維内におけるミオシン軽鎖 (LC) および重鎖 (HC) のアイソフォームの分布および持続的な運動に対するそれらの変化について、5つの研究課題を設定し、検討した。

実験 I 高強度・持久トレーニングによる筋線維組成およびミオシン軽鎖の変化

高強度・持久トレーニングによる骨格筋の適応について検討する目的で、Wistar系雄ラットに16週間のトレッドミル走を負荷し、電気泳動的・組織化学的分析を行い、以下の結果を得た。

- 1) 筋線維組成については、長指伸筋ではFG線維の減少、FOG線維の増加が、またヒラメ筋ではSO線維の増加が認められた。
- 2) LCについては、ヒラメ筋では変化が認められなかった。一方、長指伸筋ではLC3fの減少が認められた。

これらのことから、高強度・持久トレーニングを量的に十分行うことにより、特定の筋ではtype II 線維からtype I 線維へのタイプ移行が起こることが示唆された。

実験 II 協同筋切除によるミオシン重鎖および軽鎖の変化

収縮活動量の増加に伴うHCおよびLCアイソフォームの変化を詳細に

検討することを目的として、ラットに腓腹筋とヒラメ筋を切除する手術を施し、術後2、4、6、8週間後に残存の足底筋を対象に電気泳動学的分析を行い、以下の結果を得た。

- 1) slow type HC (HCI) およびLC (LC1sおよびLC2s) は、どちらも術後6週目以降に増加が認められた。
- 2) fast type HCの中では、HCIIBが最も著しく、また早期に変化し、術後2週目に約50%の減少が認められた。また、HCIIAは術後4週目以降に増加することが、HCIIDは術後2週目と8週目のみに増加することが観察された。
- 3) 電気泳動によるHCの分画において未知のバンドが検出され、このバンドは術後8週目に減少した。
- 4) LC1fに対するLC3fの比は、術後6週目以降に減少することが認められた。

収縮活動量の増加に対して、fast type 内での変化はLCよりHCにおいて早期に生じることが明らかになった。これは、HCIIBの減少がalkali LCの変化を促進しているとする推察を支持するものである。

実験 III ラットおよびラビットの単一筋線維におけるミオシン軽鎖の分布

ラットおよびラビットの各タイプの単一筋線維におけるLCの分布を検討する目的で、長指伸筋から単一筋線維を剥離しHCおよびLCを分画

し、以下の結果を得た。

- 1) ラットでは、fast alkali LCに対するLC3fの比はtype IIB > type IID > type IIAの順で大きかった。
- 2) ラビットでは、fast alkali LCに対するLC3fの比はtype IIA線維に比べtypeIID線維において高い傾向にあった。
- 3) 同一タイプの筋線維内においては、fast alkali LCに対するLC3fの比のレンジは大きく、異なるタイプの筋線維間ではかなりの部分にオーバーラップがみられた。

これらの結果は、同タイプの単一筋線維において収縮特性が異なるのは、fast alkali LCの分布比率の違いに原因があるとする知見を支持するものである。また、収縮活動量の増加に伴うLC3fの減少はHCとLCの親和性と関連があるものと推察される。

実験 IV ラビット単一筋線維におけるアイソミオシンの分布

ピロリン酸ゲル電気泳動 (PPI-PAGE) におけるfast type アイソミオシンを正確に同定すること、およびドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) から得られたLCに関する定量的データが、生体内で機能しているものを反映しているかを検討することを目的として、単一筋線維に発現しているアイソミオシンを分画し、以下の結果を得た。

- 1) PPI-PAGEにおける移動速度は、FMb > FMd > FMaの順で高いことが認められた。
- 2) 長指伸筋のFMdと比べ腰筋のFMdの方が、ゲル上にお

ける移動速度が速いことが示された。

- 3) FM1/FM3の比は、type IIB > type IID > type IIAの順で高いことが認められた。
- 4) 同一筋線維タイプ内におけるFM1およびFM3の分布には、比較的大きな偏差があることが認められた。

以上のことから、PPi-PAGEにより分画される9種類のfast type アイソミオシンが正確に同定されるとともに、SDS-PAGEのLCについての定量的な結果は、少なくとも正常な速筋では細胞内で機能しているものを反映していることが示唆された。

実験 V ヒト骨格筋におけるミオシン重鎖と軽鎖の親和性

ヒト骨格筋におけるLCの分布について検討する目的で、ニードルバイオプシー法により外側広筋よりサンプルを採取し、それらに組織化学的および電気泳動学的分析を施し、以下の結果を得た。

- 1) 筋に占めるtype I 線維の面積比 (% type I area; X) と slow type LC (LC1sおよびLC2s)の割合 (Y) との間に有意な正の相関関係が認められた。この回帰直線は $Y=X$ のラインより下方に位置した。
- 2) %type II areaに対する%type IIA areaの比とfast alkali LCに対するLC1fの比の間に有意な正の相関関係が認められた。

これらの結果から、ヒトの骨格筋ではtype I 線維の幾つかはslow type

LCに加えfast type LCを発現していることが示唆されるとともに、type IIA 線維はLC1fを、それに対してtype IIB/D 線維はLC3fを多く発現しており、HCとLCの間に特異的な親和性が存在すると推察される。

XI. 結 論

本研究の結果から得られた結論は、以下に示す通りである。

1. 収縮活動量の増大によってtype II 線維のサブグループのみならず、type II 線維からtype I 線維への移行も起こるが、それは特定の筋では持久トレーニングによっても生じる。また、トレーニングはfast type ミオシン軽鎖 3 (LC3f) の減少も起こし、これがtype II 線維内での収縮速度低減の原因の1つであると思われる。
2. ラット骨格筋では収縮活動量の増大に伴って、筋線維内のミオシン重鎖 (HC) の分布は、HClIB→HClID→HClIAの順で変化する。この変化においてHClIB→HClIDの移行は、HClID→HClIAの移行あるいはLC3fの減少より早期に起こる。
3. ラットおよびラビット骨格筋では fast alkali LCに占めるLC3fの分布は、type IIB > type IID > type IIA の順で、ヒトではtype IIB/D > type IIA の順で高く、fast alkali LCとfast type HCとの間に特異的な親和性が存在するものと考えられる。
4. これまで知られているもの以外の未知のHCあるいはLCのアイソフォームが存在すると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、長年にわたり懇切丁寧な御指導を賜わりました筑波大学勝田 茂教授、二次元電気泳動の実験方法を御教授くださいました筑波大学平林民雄教授、論文作成に際して御校閲を賜わりました筑波大学浅野勝己教授、西平賀昭助教授に深甚なる謝意を表わします。また、本研究の一部はコンスタンツ大学生物学部で行われたものであり、物心両面にわたって援助してくださいました同大学 D. Pette 教授に心から御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Aigner, S., Gohlsch, B., Hamalainen, N., Staron, R. S., Uber, A., Wehrle U., & Pette, D. (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates. *Eur. J. Biochem.* 211: 367-372.
- Andersen, J. L., Klitgaard, H., Bangsbo, J., & Saltin, B. (1994) Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of soccer players: effects of strength-training. *Acta Physiol. Scand.* 150: 21-26.
- Andersen, P. & Henriksson, J. (1977) Capillary supply of quadriceps femoris muscle of man: active response to exercise. *J. Physiol.* 270: 677-690.
- Arnold, H. H., Lohse, P., Seidel, U., & Bober, E. (1988) A novel human alkali light chain is developmentally regulated: expression in fetal cardiac and skeletal muscle and adult atria. *Eur. J. Biochem.* 178: 53-60.
- Asmussen, G., Traub, I., & Pette, D. (1993) Electrophoretic analysis of myosin heavy chain isoform patterns in extraocular muscles of the rat. *FEBS Lett.* 335: 243-245.
- 跡見順子, 八田秀雄, 山本順子, 山田 茂, 浅見俊雄, 黒田善雄 (1985) ラットのトレッドミル走におけるスピード- Vo_{2max} の関係および Vo_{2max} の測定方法の検討. *東京大学教養学部体育学紀要* 19: 69-73.
- Baldwin, K. M., Valdez, V., Herrick, R. E., MacIntoch, A. M., & Roy, R. R. (1982) Biochemical properties of overloaded fast-twitch muscle. *J. Appl. Physiol.* 52: 467-472.
- Baldwin, K. M., Winder, W. W., Terjung, R. L., & Holloszy, J. O. (1973) Glycolytic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise. *Am. J. Physiol.* 225: 962-966.
- Bar, A. & Pette, D. (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 235: 153-155.
- Bar, A., Simoneau, J.-A., & Pette, D. (1989) Altered expression of myosin light-chain isoforms in chronically stimulated fast-twitch muscle of the rat. *Eur. J. Biochem.* 178: 591-594.
- Bárány, M. (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 50: 197-218.

- Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T., & Peter, J. B. (1971) Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* 220: 410-414.
- Baron, G., Demaille, J., & Dutruge, M. (1975) The distribution of parvalbumin in muscle and other tissues. *FEBS Lett.* 56: 156-160.
- Barsotti, R. S. & Butler, T. M. (1984) Chemical energy usage and myosin light chain phosphorylation in mammalian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5: 45-64.
- Barton, P. J. R. & Buckingham, M. E. (1985) The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.* 231: 249-261.
- Barton, P. J. R., Cohen, A., Robert, B., Fiszman, M. Y., Bonhomme, F., Guenet, J. L., Leader, D. P., & Buckingham, M. E. (1985) The myosin alkali light chains of mouse ventricular and slow skeletal muscle are indistinguishable and are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* 260: 8578-8584.
- Berchtold, M. W., Rowlerson, A. M., & Heizmann, C. W. (1982) Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 3: 456-460.
- Bergh, U., Thorstensson, A., Sjödin, B., Hulten, B., Piehl, K., & Karlsson, J. (1978) Maximal oxygen uptake and muscle fiber types in trained and untrained humans. *Med. Sci. Sports* 10: 151-154.
- Bergström, J. (1962) Muscle electrolytes in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Suppl)* 68: 1-110.
- Billeter, R., Heizmann, C. W., Howald, H., & Jenny, E. (1981) Analysis of myosin light chain and heavy chain types in single human skeletal muscle fibres. *Eur. J. Biochem.* 116: 389-395.
- Billeter, R., Heizmann, C. W., Reist, U., Howald, H., & Jenny, E. (1982) Two-dimensional peptide analyses of myosin heavy chains and actin from single-typed human skeletal muscle fibers. *FEBS Lett.* 139: 45-48.
- Biral, D., Betto, R., Daniel-Betto, D., & Salviati, G. (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem. J.* 250: 307-308.

- Biral, D., Damiani, E., Volpe, P., Salviati, G., & Margreth, A. (1982) Polymorphism of myosin light chain: an electrophoretic and immunological study of rabbit skeletal-muscle myosins. *Biochem. J.* 203: 529-540.
- Bottinelli, R., Betto, R., & Reggiani, C. (1993) Maximum shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition of skinned fast fibres from rat skeletal muscles. *J. Physiol.* 473: 86.
- Bottinelli, R., Betto, R., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1994) Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15: 413-419.
- Bottinelli, R., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1991) Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform comparisons of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 437: 655-672.
- Brahms, J., & Brezner, J. (1961) Interaction of myosin A with ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 219.
- Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R., & MacLennan, D. H. (1987) Adult forms of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum: expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 3768-3774.
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. (1969) Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 389-395.
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. (1970a) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH and sulphhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 670-672.
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. (1970b) Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23: 369-379.
- Brown, W. E., Salmons, S., & Whalen, R. G. (1983) The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. *J. Biol. Chem.* 258: 14686-14692.
- Burridge, K. (1974) A comparison of fibroblast and smooth muscle myosin. *FEBS Lett.* 45: 14-17.
- Carraro, U., & Catani, C. (1983) A sensitive SDS-PAGE methods separating myosin

- heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 793-802.
- Carraro, U., Dalla-Libera, L., & Catani, C. (1981) Myosin light chains of avian and mammalian slow muscles: evidence of intraspecific polymorphism. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2: 335-342.
- Cavaille, F., Janmot, C., Ropert, S., & d'Albis, A. (1986) Isoform of myosin and actin in human, monkey and rat myometrium: comparison of pregnant and non-pregnant uterus proteins. *Eur. J. Biochem.* 160: 507-513.
- Celio, R., & Heizmann, C. W. (1982) Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres. *Nature* 39: 504-506.
- Costill, D. L., Daniels, J., Evans, W., Fink, W., Krahenbuhl, G. & Saltin, B. (1976a) Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. *J. Appl. Physiol.* 40: 149-154.
- Costill, D. L., Fink, W. J., & Pollock, M. L. (1976b) Muscle fiber composition and enzyme activities of elite distance runners. *Med. Sci. Sports* 8: 96-100.
- Coyle, E. F., Costill, D. L. & Lesmes, G. R. (1979) Leg extension power and muscle fiber composition. *Med. Sci. Sports* 11: 12-15.
- Cummins, P. (1982) Transitions in human atrial and ventricular myosin light-chain isoenzymes in response to cardiac-pressure-induced hypertrophy. *Biochem. J.* 205: 195-204.
- d'Albis, A. & Gratzer, W. B. (1973) Electrophoretic examination of native myosin. *FEBS Lett.* 29: 292-296.
- d'Albis, A., Janmot, C., & Bechet, J. J. (1986) Comparison of myosins from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea-pig: persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur. J. Biochem.* 156: 291-296.
- d'Albis, A., Janmot, C., Mira, J.-C., & Couteaux, R. (1991) Characterization of a ventricular V1 myosin isoform in rabbit masticatory muscles: developmental and neural regulation. *BAM* 1: 23-34.
- d'Albis, A., Pantaloni, C., & Bechet, J. J. (1979) An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.* 99: 261-272.

- Dalla Libera, L. (1988) A comparative study of chicken ventricular and slow skeletal myosin light chain. *Cell Biol. Int. Rep.* 12: 1089-1098.
- Dalla Libera, L., Margreth, A., Mussini, I., Cerri, C., & Scarlato, G. (1978) Myosin polymorphism in human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1: 280-291.
- Danieli-Betto, D., Zerbato, E., & Betto, R. (1986) Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 981-987.
- DeNardi, C., Ausoni, S., Moretti, P., Gorza, L., Velleca, M., Buckingham, M., & Schiaffino, S. (1993) Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J. Cell Biol.* 123: 823-835.
- Denton, R. M., Randle, P. J., & Martin, B. R. (1972) Stimulation by Ca^{2+} of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem. J.* 128: 161-163.
- Donaldson, S. K. B., & Hermansen, L. (1978) Differential direct effects of H^+ on Ca^{2+} -activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac, and adductor magnus muscles of rabbits. *Pflügers Arch.* 376: 55-65.
- Doucet, J. P., Murphy, B. J. & Tuana, B. S. (1990) Modification of a discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel system for minigel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 190: 209-211.
- Drews, G. A., & Engel, W. K. (1966) Reversal of the ATPase reaction in fibers by EDTA. *Nature* 212: 1551-1553.
- Dudley, G., Abraham, W. M., & Terjung, R. J. (1982) Influence of exercise intensity and duration in biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53: 844-850.
- Eddinger, T. J., & Moss, R. L. (1987) Mechanical properties of skinned single fibers of identified types from diaphragm. *Am. J. Physiol.* 253: C210-C218.
- Edgerton, V. R. & Simpson, D. R. (1969) The intermediate fiber of rats and guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 828-838.
- Edwards, R. H. T., Hill, D. K., & Jones, D. A. (1975) Metabolic changes associated with the slowing of relaxation in fatigued mouse muscle. *J. Physiol.* 251: 287-301.

- Faulkner, J. A., Clafin, D. R., & McCully, K. K. (1986). Power output of fast and slow fibers from human skeletal muscles. In: N. L. Jones, N. McCarthney, & A. J. MacComas (Eds.), *Human muscle power*. Human Kinetics Publishers Inc., Champaign, Illinois, pp. 81-94.
- Fitzsimons, D. P., Diffie, G. M., Herrick, R. E., & Baldwin, K. M. (1990a) Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch muscles. *J. Appl. Physiol.* 68: 1950-1955.
- Fitzsimons, D. P., Herrick, R. E., & Baldwin, K. M. (1990b) Isomyosin distributions in rodent muscles: effects of altered thyroid state. *J. Appl. Physiol.* 69: 321-327.
- Fitzsimons, R. B., & Hoh, J. F. Y. (1981) Isomyosin in human type 1 and type 2 skeletal muscle fibres. *Biochem. J.* 193: 229-233.
- Fitzsimons, R. B., & Hoh, J. F. Y. (1983) Myosin isoenzymes in fast-twitch and slow-twitch muscles of normal and dystrophic mice. *J. Physiol.* 343: 539-550.
- Frank, G. & Weeds, A. G. (1974) The amino acid sequence of the alkali light chains of rabbit skeletal muscle myosin. *Eur. J. Biochem.* 44: 317-334.
- Fuchtbauer, E. M., Rowleson, A. M., Gotz, K., Friedrich, G., Mabuchi, K., Gergely, J., & Jockusch, H. (1991) Direct correlation of parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activities on frozen sections of rodent muscle. *J. Cytochem. Histochem.* 39: 355-361.
- Gagnon, J., Gregory, P., Kurowski, T., & Zak, R. (1990). Change in protein synthesis during induced muscle fiber transformation. In: D. Pette (Ed.) *The dynamic state of muscle fibers*. de Gruyter, Berlin, New York, pp. 481-495.
- Gaines, G., Rossi, C., & Attardi, G. (1987) Markedly different ATP requirements for rRNA synthesis and mDNA light strand transcription versus mRNA synthesis in isolated human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262: 1907-1915.
- Gauthier, G. F., Lowey, S., Benfield, P. A., & Hobbs, A. W. (1982) Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 92: 471-484.
- Gerday, C. & Gillis, J. M. (1976) The possible role of parvalbumins in the control of contraction. *J. Physiol.* 258: 96-97.

- Gollnick, P. D., Armstrong, R. B., Saubert IV, C. W., Piehl, K. & Saltin, B. (1972) Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* 33: 312-319.
- Gollnick, P. D. & Hodgson, D. R. (1986). The identification of fiber types in skeletal muscle: a continual dilemma. In: K. B. Pandorf (Ed.), *Exercise and sport sciences reviews*. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 81-104.
- Gollnick, P. D., Korge, P., Karpakka, J., & Saltin, B. (1991) Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiol. Scand.* 142: 135-136.
- Gollnick, P. D. & Matoba, H. (1984) Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensitivity of myofibrillar actomyosin ATPase to copper. *Histochemistry* 81: 379-383.
- Gollnick, P. D., Parsons, D., & Oakley, C. R. (1983) Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry* 77: 543-555.
- Gorza, L. (1990) Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 257-265.
- Greaser, M. L., Moss, R. L., & Reiser, P. J. (1988) Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chain. *J. Physiol.* 406: 85-98.
- Green, H. J., Dusterhoft, S., Dux, L., & Pette, D. (1992) Metabolite patterns related to exhaustion, recovery and transformation of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.* 420: 359-366.
- Green, H. J., Klug, G. A., Reichmann, H., Seedorf, U., Wiehrer, W., & Pette, D. (1984) Exercise-induced fibre type transformation with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflügers Arch.* 400: 432-438.
- Gregory, P., Low, R. B., & Stirewalt, W. S. (1986) Changes in skeletal-muscle myosin isoenzymes with hypertrophy and exercise. *Biochem. J.* 238: 55-63.
- Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J., & Robbins, J. (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J. Biol. Chem.* 266:

9180-9185.

- Guth, L. & Samaha, F. J. (1969) Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.* 25: 138-152.
- Hamalainen, N. & Pette, D. (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 733-743.
- Hamoir, G., Gerardin-Otthiers, N., & Focant, B. (1980) Protein differentiation of the superfast swimbladder muscle of the toadfish *Opsanus tau*. *J. Mol. Biol.* 143: 155-160.
- Hirabayashi, T. (1981) Two-dimensional gel electrophoresis of chicken skeletal muscle proteins with agarose gels in the first dimension. *Anal. Biochem.* 117: 443-451.
- Hoh, J. F. Y. (1975) Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins: an electrophoretic analysis. *Biochemistry* 14: 742-747.
- Hoh, J. F. Y., McGrath, P. A., & White, R. I. (1976) Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch of the chick. *Biochem. J.* 157: 87-95.
- Hoh, J. F. Y., & Yeoh, G. P. S. (1979) Rabbit skeletal myosin isoenzymes from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscles. *Nature* 280: 321-322.
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O., & Straub, R. (1985) Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Arch.* 403: 369-376.
- Hulten, B., Thorstensson, A., Sjodin, B., & Karlsson, J. (1975) Relationship between isometric endurance and fibre types in human leg muscle. *Acta Physiol. Scand.* 93: 135-138.
- Ianuzzo, C. D., Gollnick, P. D., & Armstrong, R. (1976) Compensatory adaptations of skeletal muscle fiber types of a long term functional overload. *Life Sci.* 19: 1517-1524.
- Inesi, G. (1973) Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1: 191-210.
- Inesi, G., Millman, M., & Eletr, S. (1973) Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Mol. Biol.* 81: 483-504.

- Ivy, J. I., Withers, T., Handel, P. J. V., Elger, D. H., & Costill, D. L. (1980) Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold. *J. Appl. Physiol.* 48: 523-527.
- Jandreski, M. A., Sole, M. J., & Liew, C.-C. (1987) Two different forms of beta myosin heavy chain are expressed in human striated muscle. *Hum. Genet.* 77: 127-131.
- Jansson, E., Sjodin, B., & Tesch, P. (1978) Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. *Acta Physiol. Scand.* 104: 235-237.
- 勝田 茂 (1974) ラット骨格筋の活動性肥大に関する電子顕微鏡的研究. *体力科学* 23: 67-76.
- 勝田 茂, 金尾洋治, 満園良一 (1984) トレーニング効果から見た持久トレーニングの量的限界に関する組織化学的研究. *デサントスポーツ科学* 5: 213-220.
- 勝田 茂, 大森 肇, 宮田浩文 (1985) 発育期におけるパワースプリントトレーニングの適時性に関する研究. *体力科学* 34: 39-48.
- 勝田 茂, 和田正信 (1986) 筋線維組成と運動競技適性. *デサントスポーツ科学* 7: 34-43.
- Kelly, A. M. (1980) Emergence of specialization in skeletal muscle. In: L. D. Peachey (Ed.) *Handbook of physiology. Skeletal muscle.* Am. Physiol. Soc., sect. 10, chapt. 19, pp. 507-537.
- Kirschbaum, B. J., Scheider, S., Izumo, S., Mahdavi, V., Nadal-Ginard, B., & Pette, D. (1990) Rapid and reversible changes in myosin heavy chain expression in response to increased neuromuscular activity of rat fast-twitch muscle. *FEBS Lett.* 268: 75-78.
- Kirschbaum, B. J., Simoneau, J.-A., Bar, A., Barton, P. J. R., Buckingham, M. E., & Pette, D. (1989a) Chronic stimulation-induced changes of myosin light chains at the mRNA and protein levels in rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* 179: 23-29.
- Kirschbaum, B. J., Simoneau, J.-A., & Pette, D. (1989b) Dynamics of myosin expression during the induced transformation of adult rat fast-twitch muscle. In: L. H. Kedes & F. E. Stockdale (Eds.), *Cellular and molecular biology of muscle development.* Alan. R. Liss, Inc., New York, pp. 461-469.
- Klitgaard, H., Zhou, M., Schiaffino, S., Betto, R., Salviati, G., & Saltin, B. (1990) Ageing

- alters the myosin heavy chain composition of single fibres from human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 140: 55-62.
- Komi, P. V., Viitasalo, J. H. T., Havu, M., Thorstensson, A., Sjodin, B., & Karlsson, J. (1977) Skeletal muscle fibres and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol. Scand.* 100: 385-392.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LaFramboise, W. A., Daood, M. J., Guthrie, R. D., Moretti, P., Schiaffino, S., & Ontell, M. (1990) Electrophoretic separation and immunological identification of type 2X myosin heavy chain in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1035: 109-112.
- Larsson, L., Biral, D., Campione, M., & Schiaffino, S. (1993) An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 147: 227-234.
- Larsson, L. & Moss, R. L. (1993) Maximum velocity of shortening in relation to isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J. Physiol.* 472: 595-614.
- Leberer, E., Hartner, K.-T., & Pette, D. (1987) Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* 162: 555-561.
- Leberer, E., Seedorf, U., & Pette, D. (1986) Neural control of gene expression in skeletal muscle: calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles. *Biochem. J.* 239: 295-300.
- Leinwand, L. A., Saez, L., McNally, E., & Nadal-Ginard, B. (1983) Isolation and characterization of human myosin heavy-chain genes. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 766-769.
- Lewis, S. E. M., Anderson, P., & Goldspink, D. F. (1982) The effects of calcium on protein turnover in skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.* 204: 257-264.
- Libera, L. D. (1988) A comparative study of chicken ventricular and slow skeletal myosin light chain. *Cell Biol. Int. Rep.* 12: 1089-1098.
- Lind, A. & Kernell, D. (1991) Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: a "two-dimensional" quantitative approach. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 589-597.

- Locker, R. H. & Hagyard, C. J. (1967) Variation in the small subunits of different myosins. *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 521-522.
- Lompre, A., Nadal-Ginard, B., & Mahdavi, V. (1984) Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain gene is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* 259: 6437-6446.
- Lowey, S. (1986) Cardiac and skeletal muscle myosin polymorphism. *Med. Sci. Sports Exerc.* 18: 284-291.
- Lowey, S., Waller, G. S., & Trybus, K. M. (1993) Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speed of shortening. *Nature* 365: 454-456.
- Luckin, K. A., Favero, T. G., & Klug, G. A. (1991) Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca^{2+} -ATPase of rat muscle. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 46: 391-405.
- Mabuchi, K., Pinter, K., Mabuchi, M. S., Sreter, F., & Gergely, J. (1984) Characterization of rabbit masseter muscle fiber. *Muscle Nerve* 7: 431-438.
- Mabuchi, K. & Sreter, F. A. (1980) Actomyosin ATPase II fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle Nerve* 3: 233-239.
- Mabuchi, K., Szvetko, D., Pinter, K., & Sreter, F. A. (1982) Type IIB to IIA fiber transformation in intermittently stimulated rabbit muscles. *Am. J. Physiol.* 242: C373-C381.
- MaGrath, J. A. & Goldspink, D. F. (1980) The effects of glucocorticoids on protein turnover and growth of different striated muscles in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 8: 448-449.
- Mahdavi, V., Izumo, S., & Nadal-Ginard, B. (1987) Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Cir. Res.* 60: 804-814.
- Mahdavi, V., Strehler, E. E., Periasamy, M., Wieczorek, D. F., Izumo, S., & Nadal-Ginard, B. (1986) Sarcomeric myosin heavy chain gene family: organization and pattern of expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* 18: 299-308.
- Maier, A., Gambke, B., & Pette, D. (1986) Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 244: 635-643.

- Maier, A., Gorza, L., Schiaffino, S., & Pette, D. (1988) A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast-to-slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 254: 59-68.
- Maier, A. & Pette, D. (1987) The time course of glycogen depletion in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.* 408: 338-342.
- Marechal, G., Schwartz, K., Beckers-Bleukx, G., & Ghins, E. (1984) Isozymes of myosin in growing and regenerating rat muscle. *Eur. J. Biochem.* 138: 421-428.
- Matoba, H., Allen, J. A., Bayly, W. M., Oakley, C. R., & Gollnick, P. D. (1985) Composition 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.
- Matoba, H. & Gollnick P. D. (1984) Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase. *Histochemistry* 80: 609-614.
- Matsuda, G., Maita, T., & Umegane, T. (1981) The primary structure of L-1 light chain fast skeletal muscle myosin and its genetic implication. *FEBS Lett.* 126:111-113.
- Maughan, R. J., Nimmo, M. A., & Harmon, M. (1985) The relationship between muscle myosin ATP-ase activity and isometric endurance in untrained male subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 54: 291-296.
- 宮田浩文, 佐度山亜兵, 勝田 茂 (1985) 等尺性収縮における外側広筋の筋電位伝導速度.-その筋線維組成との関連-. *体力科学* 34: 231-238.
- Moerland, T. S., Wolf, N. G., & Kushmerick, M. J. (1989) Administration of a creatine analogue induces isomyosin transition in muscle. *Am. J. Physiol.* 257: C810-C816.
- Moore, R. L., Houston, M. H., Iwamoto, G. A., & Stull, J. T. (1985) Phosphorylation of rabbit skeletal muscle P-light chain in situ. *J. Cell Physiol.* 125: 301-305.
- Moore, R. L. & Stull, J. T. (1984) Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscle in situ. *Am. J. Physiol.* 247: C462-C471.
- Moss, R. L., Reiser, P. J., Greiser, M. L., & Eddinger, T. J. (1990) Varied expression of myosin alkali light chains is associated with altered speed of contraction in rabbit fast twitch skeletal muscle. In: D. Pette (Ed.), *The dynamic state of muscle fibers*. Walter

de Gruyter, Berlin • New York, pp. 355-368.

- Nabeshima, Y-I., Fuji-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., & Ogata, K. (1984) Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. *Nature* 308; 333-338.
- Nachlas, M. M., Walker, D. G., & Seligman, M. (1958) A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 4: 29-43.
- Noble, E. G., Dabrowski, B. L., & Ianuzzo, C. D. (1983) Myosin transformation in hypertrophied rat muscle. *Pflügers Arch.* 396: 260-262.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R., & Morris, N. R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 105: 361-363.
- Oakley, C. R. & Gollnick, P. D. (1985) Conversion of rat muscle fiber types: a time course study. *Histochemistry* 83: 555-560.
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-demensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Padykula, H. A. & Herman, E. (1955) The specificity of the histochemical methods for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 3: 170-179.
- Pemrick, S. M. (1980) The phosphorylated L2 light chain of skeletal muscle myosin in a modifier of the actomyosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 255: 8836-8841.
- Periasamy, M., Strehler, E. E., Garfinkel, L. I., Gubits, R. M., Ruiz-Opazo, N., & Nadal-Ginard, B. (1983) Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *J. Biol. Chem.* 259: 13595-13604.
- Persechini, A. & Stull, J. T. (1984) Phosphorylation kinetics of skeletal muscle myosin and the effect of actomyosin ATPase activity. *Biochemistry* 23: 4144-4150.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., & Stempel, K. E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627-2633.
- Peter, J. B., Sawaki, S., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., & Gillespie, C. A. (1971) Lactate

- dehydrogenase isozymes: distribution in fast-twitch red, fast-twitch white, and slow-twitch intermediate fibers of guinea pig skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 144: 304-307.
- Pette, D. (1966) Mitochondrial enzyme activities. In: J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, & E. C. Slater (Eds.) *Regulation of metabolic processes in mitochondria*. Elsevier, Amsterdam, pp. 28-50.
- Pette, D. (1986) Regulation of phenotype expression in skeletal muscle fibers by increased contractile activity. In: B. Saltin (Ed.), *Biochemistry of exercise VI. Human Kinetics Publishers Inc., Champaign*, pp. 3-26.
- Pette, D. (1992) Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle. *J. Heart Lung Transplant.* 11: S299-S305.
- Pette, D. & Bucher, T. (1963) Proportionskonstante Gruppen in Beziehung zur Differenzierung der Enzymaktivitätsmuster von Skelett-Muskeln des Kaninchens. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* 331: 180-195.
- Pette, D., Henriksson, J., & Emmerich, M. (1979) Myofibrillar proteins of single fibres from human muscle. *FEBS Lett.* 103: 152-155.
- Pette, D., Muller, W., Leisner, E., & Vrbova, G. (1976) Time dependent effects on contractile properties, fibre population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittently and continuously stimulated fast twitch muscles of rabbit. *Pflugers Arch.* 364: 103-112.
- Pette, D. & Staron, R. S. (1988). Molecular basis of the phenotypic characteristics of mammalian muscle fibres. In: D. Evered & J. Whelan (Eds.), *Plasticity of the neuromuscular system*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 22-34
- Pette, D. & Staron, R. S. (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116: 1-76.
- Pette, D. & Vrbova, G. (1992) Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 120: 116-202.
- Pierobon-Bormioli, S. P., Torresan, P., Sartore, S., Moschini, G. B., & Schiaffino, S. (1979) Immunohistochemical identification of slow-tonic fibers in human extrinsic eye muscles. *Invest. Opththal. Vis. Sci.* 18: 303-306.

- Pinter, K., Mabuchi, K., & Sreter, F. A. (1981) Isoenzymes of rabbit slow myosin. *FEBS Lett.* 128: 336-338.
- Potter, J. D., Johnson, J. D., & Mandel, F. (1978) Fluorescence stopped flow measurements of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to parvalbumin. *Fed. Proc.* 37: 1608.
- Ranvier, L. (1873) Proprietes et structures differetes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins at chez les raies. *C. R. Acad. Sci.* 77: 1030-1034.
- Reichmann, H., Hoppeler, H., Mathieu-Costello, O., vonBergen, F., & Pette, D. (1985) Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflügers Arch.* 404: 1-9.
- Reichmann, H., Wasl, R., Simoneau, J.-A., & Pette, D. (1991) Enzyme activities of fatty acid oxidation and the respiratory chain in chronically stimulated fast-twitch muscle of the rat. *Pflügers Arch.* 418: 572-574.
- Reiser, P. J., Kasper, C. E., Greaser, M. L., & Moss, R. L. (1988) Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 254: C605-C613.
- Reiser, P. J., Moss, R. L., Giulian, G. G., & Greaser, M. L. (1985) Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J. Biol. Chem.* 260: 9077-9080.
- Robert, B., Weydert, A., Caravari, M., Minty, A., Cohen, A., Daubas, P., Gros, F., & Buckingham, M. (1982) cDNA recombinant plasmid complementary to mRNAs for light chains 1 and 3 of mouse skeletal muscle myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 2437-2441.
- Robertson, S. P. & Kerrick, W. G. L. (1979) The effect of pH on Ca^{2+} -activated force in frog skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch.* 380: 41-45.
- Romanul, F. C. A. (1964) Enzymes in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers. *Arch. Neurol.* 11: 355-368.
- Roy, R. R., Baldwin, K. M., Martin, T. P., Chimarusti, S. P., & Edgerton, V. R. (1985) Biochemical and physiological changes in overloaded rat fast- and slow-twitch ankle extensors. *J. Appl. Physiol.* 59: 639-646.
- Rushbrook, J. I. & Stracher, A. (1979) Comparison of adult, embryonic, and dystrophic

- myosin heavy chains from chicken muscle by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 76: 4331-4334.
- Salmons, S. & Vrbova, G. (1969) The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol.* 201: 535-549.
- Saltin, B. & Gollnick, P. D. (1983) Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: L. D. Peachey (Ed.) *Handbook of physiology. Skeletal muscle.* Am. Physiol. Soc., sect. 10, chapt 19, pp. 555-631.
- Sant'Ana Pereira, J. A. A. & Moorman, A. F. M. (1994) Do type IIB fibres from human muscle correspond to the IIX/D fibres of the rat? *J. Physiol.* 479: 161.
- Sarkar, N. K. (1950) Effects of salts on the isoelectric point of myosin. *Enzymologia* 15: 1-2.
- Sawchak, J. A., Leung, B., & Shafiq, S. A. (1992) Evidence for new isoform of fast myosin heavy chain in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 15: 1349-1353.
- Schantz, P., Billeter, R., Henriksson, J., & Jansson, E. (1982) Training-induced increase in myofibrillar ATPase intermediate fibers in human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 5: 628-636.
- Scherer, N. M. & Deamer, D. W. (1986) Oxidative stress impaire the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{2+} -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 589-601.
- Schiaffino, S., Ausoni, S., Saggin, L., Gundersen, K., & Lomo, T. (1988) Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.* 134: 575-576.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Gundersen, K., & Lomo, T. (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10: 197-205.
- Schiaffino, S., Saggin, L., Viel, A., & Gorza, L. (1985) Differentiation of fibre types in rat skeletal muscle visualized with monoclonal antimyosin antibodies. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6: 60-61.
- Schiaffino, S., Saggin, L., Viel, A., Ausoni, S., Sartore, S., & Gorza, L. (1986) Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: G. Benzi,

- L. Packer, & N. Siliprandi (Eds.) Biochemical aspects of physical exercise. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 27-34.
- Schmitt, T. L. & Pette, D (1991) Fiber type-specific distribution of parvalbumin in rabbit skeletal muscle. *Histochemistry* 96: 459-465.
- Seedorf, K., Seedorf, U., & Pette, D. (1983) Coordinate expression of alkali and DTNB myosin light chains during transformation of rabbit fast muscle by chronic stimulation. *FEBS Lett.* 158: 321-324.
- Seidel, J. C. (1967) Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. II. Inactivation of myosin from muscles under mild alkali conditions. *J. Biol. Chem.* 242: 5623-5629.
- Shoubridge, E. A., Challiss, R. A. J., Hayes, D. J., & Radda, G. K. (1985) Biochemical adaptation in the skeletal muscle of rats depleted of creatine with the substrate analogue β -guanidinopropionic acid. *Biochem. J.* 232: 125-131.
- Shoubridge, E. A. & Radda, G. K. (1987) A gated ^{31}P NMR study of tetanic contraction in rat muscle depleted of phosphocreatine. *Am. J. Physiol.* 252: C532-C542.
- Simoneau, J.-A., Lortie, G., Boulay, M. R., Marcotte, M., Thibault, M. C., & Bouchard, C. (1987) Effects of two high-intensity intermittent training programs interspaced by detraining on human skeletal muscle and performance. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56: 516-521.
- Sivaramakrishnan, M. & Burke, M. (1982) The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 257: 1102-1105.
- Sjöström, M., Friden, J., & Ekblom, B. (1987) Endurance, what is it? muscle morphology after an extremely long distance run. *Acta Physiol. Scand.* 130: 513-520.
- Spamer, C. & Pette, D. (1977) Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehydephosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus. *Histochemistry* 52: 201-216.
- Sreter, F. A., Balint, M., & Gergely, J. (1975) Structural and functional changes of myosin during development. *Dev. Biol.* 46: 317-325.

- Sreter, F. A., Lopes, J. R., Alamo, L., Mabuchi, K., & Gergely, J. (1987) Changes in intracellular ionized Ca concentration associated with muscle fiber type transformation. *Am. J. Physiol.* 253: C296-C300.
- Sreter, F. A., Seidel, J. C., & Gergely, J. (1966) Studies on myosin from red and white muscles of the rabbit. I. Adenosine triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 241: 5772-5776.
- Staron, R. S. (1991) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96: 21-24.
- Staron, R. S., Gohlsch, B., & Pette, D. (1987) Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.* 408: 444-450.
- Staron, R. S., Leonardi, M. J., Karapondo, D. L., Malicky, E. S., Falkel, J. E., Hagerman, F. C., & Hikida, R. S. (1991) Strength and skeletal adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. *J. Appl. Physiol.* 70: 631-640.
- Staron, R. S. & Pette, D. (1986) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86: 19-23.
- Staron, R. S. & Pette, D. (1987a) The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres: rabbit soleus muscle. *Biochem. J.* 243: 687-693.
- Staron, R. S. & Pette, D. (1987b) The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres: rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem. J.* 234: 695-699.
- Stein, J. M. & Padykula, H. A. (1962) Histochemical classification of individual skeletal muscle fiber of rat. *Am. J. Anat.* 110: 103-124.
- Strohman, R. C., Micou-Eastwood, J., Glass, C. A., & Matsuda, R. (1983) Human fetal muscle and cultured myotubes derived from it contain a fetal-specific myosin light chain. *Science* 221: 955-957.
- Sugiura, T., Matoba, H., Miyata, H., Kawai, Y., & Murakami, N. (1992a) Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol. Scand.* 144: 419-423.
- Sugiura, T., Matoba, H., & Murakami, N. (1992b) Myosin light chain patterns in

- histochemically typed single fibers of the rat skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 617-620.
- Sugiura, T. & Murakami, N. (1990) Separation of myosin heavy chain isoforms in rat skeletal muscles by gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomed. Res.* 11: 87-91.
- Sweeney, H. L., Kushmerick, M. J., Mabuchi K., Sreter, F. A., & Gergely, J.(1988) Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 263: 9034-9039.
- Talmadge, R. J. & Roy, R. R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* 75: 2337-2340.
- Templeton, G. H., Sweeney, H. L., Timson, B. F., Padalino, M., & Dudenhoefter, G. A. (1988) Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 65: 1191-1195.
- Termin, A. & Pette, D. (1990) Electrophoretic separation by an improved method of fast myosin HClIb-, HClId-, and HClIa-based isomyosins with specific alkali light chain combinations. *FEBS Lett.* 275: 165-167.
- Termin, A. & Pette, D. (1991) Myosin heavy-chain-based isomyosins in developing, adult fast-twitch and slow-twitch muscles. *Eur. J. Biochem.* 195: 577-584.
- Termin, A. & Pette, D. (1992) Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 204: 569-573.
- Termin, A., Staron, R. S., & Pette, D. (1989a) Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. *Eur. J. Biochem.* 186: 749-754.
- Termin, A., Staron, R. S., & Pette, D. (1989b) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92: 453-457.
- Tesch, P. A. & Wright, E. (1983) Recovery from short term intense exercise: its relation to capillary supply and blood lactate concentration. *Eur. J. Appl. Physiol.* 52: 98-103.
- Thomason, D. B., Baldwin, K. M., & Herrick, R. E. (1986) Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 60: 1923-1931.

- Tsika, R. W., Herrick, R. E., & Baldwin, K. M. (1987a) Subunit composition of rodent isomyosins and their distribution in hindlimb skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 63: 2101-2110.
- Tsika, R. W., Herrick, R. E., & Baldwin, K. M. (1987b) Effect of anabolic steroids on overloaded and overloaded suspended skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63: 2128-2133.
- von Hippel, P. H., Peticolas, V., Schack, L., & Karlson, L. (1973) Model studies on the effects of neutral salts on the conformational stability of biological macromolecules. I. Ion binding to polyacrylamide and polystyrene columns. *Biochemistry* 12: 1256-1264.
- 和田正信, 勝田 茂 (1989) 筋線維タイプからみたスポーツパフォーマンス. *Jpn. J. Sports Sciences* 8: 62-68.
- Wagner, P. D. (1981) Formation and characterization of myosin hybrids containing essential light chains and heavy chains from different muscle myosins. *J. Biol. Chem.* 256: 2493-2498.
- Wagner, P. D. & Giniger, E. (1981) Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains. *Nature* 292: 560-562.
- Weeds, A. G. (1976) Light chains from slow-twitch muscle myosin. *Eur. J. Biochem.* 66: 157-173.
- Weeds, A. G. & Pope, B. (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin: effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.* 111: 129-157.
- Whalen, R. G., Butler-Browne, G. S., & Gros, F. (1978) Identification of a novel form of myosin light chain present in embryonic muscle tissue and cultured muscle cells. *J. Mol. Biol.* 126: 415-431.
- Whalen, R. G. & Sell, S. M. (1980) Myosin from fetal hearts contains the skeletal muscle embryonic light chain. *Nature* 286: 731-733.
- Whalen, R. G., Sell, S. M., Eriksson, A., & Thornell, L.-E. (1982) Myosin subunit types in skeletal muscle and cardiac tissues and their developmental distribution. *Dev. Biol.* 91: 478-484.
- Yoon, S.-J., Seiler, S. H., Kucherlapati, R., & Leinwand, L. (1992) Organization of the human skeletal myosin heavy chain gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12078-12082.

Youn, J. H., Gulve, E. A., & Holloszy, J. O. (1991) Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *Am. J. Physiol.* 260: C555-C561.

参 考 论 文

参考論文については学術雑誌掲載論文などから構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。

なお、リンク先があるものについては電子ジャーナルとして出版社から公開されています。契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

1) <http://ci.nii.ac.jp/cinii/servlet/QuotDisp?LOCALID=ART0002333585&DB=NELS&USELANG=jp>

2) <http://dx.doi.org/10.1007/BF00370616>

3) Masanobu Wada Kunio Kikuchi Shigeru Katsuta
Changes in Myosin Heavy-Chain and Light-Chain Isoforms following Sustained Exercise
Integration of Medical and Sports Sciences (8th International Biochemistry of Exercise
Conference, Nagoya, September 1991: Proceedings) Sato, Y. Poortmans, J. Hashimoto, I.
Oshida, Y. eds. Medicine and Sport Science Vol.37 pp309-317 1992

4) <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17908.x>

5) <http://dx.doi.org/10.1007/BF00121132>