

後肢懸垂によるラットヒラメ筋のミオシン重鎖組成の変化

勝田 茂・高橋 英幸*・服部 祐子**

Changes in myosin heavy chain composition of rat soleus muscle during hindlimb suspension

Shigeru KATSUTA, Hideyuki TAKAHASHI* and Yuko HATTORI**

This study examined the effects of hindlimb suspension for 1, 2 and 4wk on myosin heavy chain (HC) and muscle fiber composition of rat soleus muscle, using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and conventional histochemical technique. Normal soleus displayed only HClIa as fast HC isoform, while in suspended muscles HClId was detected in addition to HClIa. We show here for the first time that suspension causes the expression of HClId in soleus. Percentage of HClId and the animals displayed HClId increased largely at 2 wk of suspension. The “unclassified” fiber, which couldn't react to myosin ATPase stain, appeared in suspended soleus and the percentage of it also increased largely between 1 and 2 wk of suspension. These results suggest the possibility that the critical point, which remarkably changes the qualitative property of soleus muscle, exists between 1 and 2 wk of suspension.

Key words : Hindlimb suspension, Rat soleus muscle, Myosin heavy chain

I. 緒 言

宇宙空間の無重力状態による筋の変化をシュミレーションするために、ラットなどの哺乳動物を用いた懸垂モデルが発達し、このモデルを用いて数多くの研究が行われてきている。これらの研究では、組織化学的レベルでの検討はもちろんのこと、酸化系および解糖系の酵素活性分析や電気泳動法を用いたタンパク分析、さらに収縮特性分析など、幅広いアプローチが行われている。そして、骨格筋、特に遅筋線維の占める割合の多いヒラメ筋において、懸垂が速筋線維の割合の増加^{6,7,28,29)}、fast ミオシン^{28,32-34)}およびfast ミオシン重鎖 (Heavy chain ; 以下 HC と略す)アイソフォーム¹⁸⁾の相対的含有量の増加といった速筋化を引き起こすことが報告されてきている。

骨格筋の主要な収縮タンパクであるミオシン 1 分子は、2 本の HC と 4 本のミオシン軽鎖から構成されている。近年、それまでに認められていた fast HC アイソフォーム (HClIa, HClIb) の他に、免疫組織化学的手法によってHClIX²³⁾、そして電気泳動法の改良によってHClId²⁾という新しい fast HC アイソフォームの存在が確認されている。これら 2 つのアイソフォームは、電気泳動での移動度が等しかったことなどから同一のアイソフォームであると考えられている^{14,31)}。電気泳動を用いた研究では、正常なラットヒラメ筋には fast HC アイソフォームとしてはHClIa のみが存在することが報告されている^{2,27)}。これまで、懸垂によりヒラメ筋の fast HC の相対的含有量が増加することが報告されているが¹⁸⁾、どの fast HC アイソフォームが発現するのか、または増加するのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、最長 4 週間のラットの後肢

*筑波大学医学研究科

**藤沢薬品工業株式会社安全性研究所

懸垂がヒラメ筋の HC 発現に及ぼす影響を、生化学的手法を用いて経時的に分析し、組織化学的分析との比較を併せて検討することを目的とした。

II. 実験方法

1. 実験動物および懸垂の方法

実験動物には14週齢の Wistar 系雄性ラット53匹を用いた。これらを各群の平均体重が等しくなるように後肢懸垂群(Hindlimb suspension group; 以下 SUS 群と略す)(29匹)およびコントロール群(Control group; 以下 CON 群と略す)(24匹)に分類した。

SUS 群には1, 2および4週間の懸垂を負荷した。懸垂状態は以下の方法によって作り出した。ラットの尾を70%エチルアルコールで消毒した後、尾の付け根の軟骨にステンレス製のワイヤーを通し、それを回転装置を装着したU字型ボルトにつなぎ、そのボルトを後肢が床に届かない高さで固定した。U字型ボルトはワイヤーを直接吊り上げることによって生じる血流障害を防ぎ、回転装置はラットが尾を中心にして360度回転することを可能にした。一方、CON 群は14週齢時に擬手術として尾にワイヤーを通し、それをリング状に装着した状態で通常飼育を行った。

各懸垂期間の終了する15, 16および18週齢時に各群のラットの体重を測定した後、ジエチルエーテル麻酔下で両下肢よりヒラメ筋を摘出・秤量し、右脚の筋を生化学分析に、左脚の筋を組織化学的分析に供した。

全実験期間を通して飼育環境は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルに設定し、水と飼料(オリエンタル固形飼料 MF)は自由摂取とした。

2. 生化学的分析

ヒラメ筋の HC アイソフォームの割合を測定するために、Sugiura and Murakami²⁷⁾の方法に修正を加えた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法(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 以下 SDS-PAGE と略す)を行った。以下にその方法を示す。

15~20mg の筋サンプルに40倍量(W/V)の抽出液(4 M尿素, 2.6 Mチオ尿素, 0.017 M 2-メルカプトエタノール, 0.01 Mピロリン酸ナトリウム)を加え均質化した。この均質溶液にさらに SDS 処

理液(62.5 mM トリス-塩酸 pH6.8, 69.4 mM SDS, 10%グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.3 mM ブロムフェノールブルー)を加えることによって、最終的に筋サンプル1 mg に対し3,000倍の希釈度の溶液を作成した。この溶液を5~8%のアクリルアミド濃度および30~40%のグリセロール濃度勾配を付けた分離ゲルと、3.5%のアクリルアミド濃度と35%のグリセロール濃度の濃縮ゲルを用いた SDS-PAGE に供した。ここで、SUS 群の懸垂2週目および4週目の筋では、3000倍希釈では適度な濃度の染色パターンを得ることができなかったため、これらの筋に関しては1500倍希釈で行った。また、泳動パターンの同定の際に必要なマーカーとしては、被検溶液と同時に流して得られた、すべての HC アイソフォームを含む抽出溶液の泳動パターンを用いた(図1-レーン1)。

銀染色キットワコーを用いて染色した染色パターンから、デンシトメーター(FUJIOX, FD-A IV)およびコンピュータ(MZ-80Z)に接続したデジタルイザ(MITABLET-II/KD8030型)を用い、各 HC アイソフォームの割合を算出した。

3. 組織化学的分析

摘出した筋の筋腹部分を数 mm の厚さに横断し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速冷凍し、 -20°C にセットしたクリオスタットで厚さ $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作成した。これらに myosin ATPase 染色(preincubation pH10.3, 4.6, 4.3)¹⁷⁾ および NADH-tetrazolium reductase (以下 NADH-tr と略す) 染色¹⁸⁾を施し、得られた標本の顕微鏡写真から Brooke and Kaiser⁴⁾の方法にしたがって筋線維を type I, IIA, IIB および IIC 線維に分類した。また、懸垂1週目以降の SUS 群において、どの pH 領域においても感受性を示さない筋線維が認められたため、それらは“unclassified”線維として別に分類した。1つの筋において400本以上の筋線維をカウントすることによって筋線維構成比を求め、NADH-tr 染色標本から各筋線維について30本(30本存在しない場合は測定可能なすべて)の筋線維の横断面積を測定することによって平均の筋線維横断面積を算出した。さらに、筋線維構成比と各筋線維の平均の横断面積から、それぞれの筋線維の占める面積の割合(以下筋線維占有率とする)を算出した。

4. 統計処理

すべての統計量は平均値±標準誤差で示した。測定値の各群間の統計的な有意差検定には unpaired Student's t-test を用い、危険率 5% 以下を有意水準とした。

III. 実験結果

1. 体重およびヒラメ筋重量

表 1 に懸垂期間中の体重、ヒラメ筋重量の絶対値および体重に対するヒラメ筋重量の相対値の変化を示した。SUS 群の体重は懸垂 1 週目に減少し、CON 群より有意な低値 ($p < 0.001$) を示したが、それ以降はほぼ一定の値を示した。SUS 群のヒラメ筋重量の絶対値は 1 週目より CON 群より有意な低

値 ($p < 0.001$) を示し、懸垂期間の延長とともにさらに減少した (1, 2, 4 週目でそれぞれ CON 群の 69, 54, 36%)。SUS 群の体重に対するヒラメ筋重量の相対値も懸垂期間の延長に伴い減少し、懸垂 1 週目より CON 群より有意な低値 ($p < 0.01$) を示した。

2. ミオシン重鎖(HC)組成

図 1 に典型的な HC の泳動パターン、図 2 に懸垂 4 週目の筋の泳動パターンより得られたデンストメトリーによるスキャンパターンの例、そして表 2 に全 HC に対する各 HC アイソフォームの割合を示した。CON 群では HClI と HClIa のみが検出された。一方、SUS 群では懸垂 1 週目より HClId

Table 1 Body and soleus muscle weights of control and suspension groups

Period (wk)	Group	N	Body wt (g)	Muscle wt (mg)	Muscle wt/Body wt (mg/g)
1	CON	8	488.3±10.3	175.9±6.4	0.361±0.015
	SUS	10	399.9±9.9**	121.9±4.3***	0.304±0.005**
2	CON	8	503.9±11.4	165.5±4.6	0.330±0.013
	SUS	9	402.6±8.5**	88.8±3.5***	0.221±0.008***
4	CON	8	535.1±12.0	189.0±3.4	0.354±0.008
	SUS	10	411.1±12.9***	68.7±1.3***	0.168±0.004***

Values are means±SE. N, number of animals; CON, control group; SUS, suspension group. ** and *** denote significant differences from control group at 0.01 and 0.001 levels, respectively.

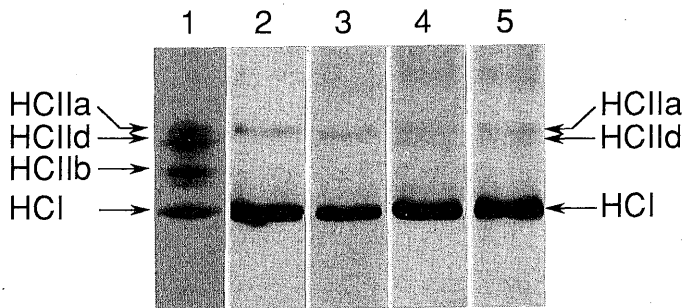


Fig. 1 Separation of myosin heavy chain (HC) isoforms of rat skeletal muscles by SDS-PAGE. Lane 1; mixture of soleus, plantaris and diaphragm, lane 2; control soleus at 4 wk of suspension, lanes 3, 4 and 5; suspended soleus at 1, 2 and 4 wk of suspension, respectively

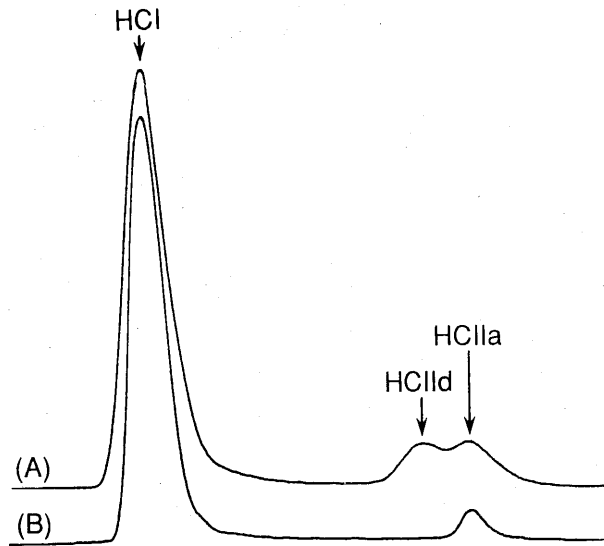


Fig. 2 Densitometric scans of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myosin heavy chain(HC) isoforms from suspended(A) and control(B) soleus at 4 wk of suspension

Table 2 Percentage of myosin heavy chain (HC) isoforms in the soleus muscles of control and suspension groups

Period (wk)	Group	N	HCl (%)	HClIa (%)	HClId (%)	HClIb (%)
1	CON	8	91.3±1.9	8.7±1.9	0	0
	SUS	10	94.9±1.4	4.9±1.2	0.2±0.2	0
2	CON	8	94.9±1.6	5.1±1.6	0	0
	SUS	9	93.4±2.4	5.5±2.2	1.1±0.3	0
4	CON	8	96.1±0.8	3.9±0.8	0	0
	SUS	10	96.4±1.2	2.2±0.6	1.4±0.5*	0

Values are means±SE. N, number of animals; CON, control group; SUS, suspension group. *denotes significant difference from control group at 0.05 level.

が検出可能となり、その割合は懸垂期間の延長に伴い増加する傾向が観察され、懸垂4週目ではCON群よりも有意な高値($p < 0.05$)を示した。また、SUS群においてHClIdが発現したラットは、懸垂1週目では10匹中1匹のみであったが、2週目では9匹中7匹、4週目では10匹中7匹において発現した。懸垂期間中、HClIaおよびHClIの

割合に両群間で差異は観察されず、HClIbは検出されなかった。

3. 筋線維組成

本研究では、HC組成との比較を行うため、筋線維組成の指標としては、量の割合すなわち面積の割合を表す筋線維占有率を用いることにした。表

Table 3 Percent area of muscle fibers in the soleus muscles of control and suspension groups

Period (wk)	Group	N	Fiber type (%)				
			I	IC	IIA	IIB	unclassified
1	CON	8	87.1±1.7	2.0±0.6	10.9±1.7	0	0
	SUS	10	88.5±1.6	1.4±0.5	10.0±1.7	0	0.1±0.1
2	CON	8	89.6±2.3	1.4±0.5	9.0±2.2	0	0
	SUS	9	78.5±2.9*	0.4±0.2	7.4±1.3	0	13.7±2.8***
4	CON	8	89.9±2.2	1.1±0.3	9.0±2.2	0	0
	SUS	10	72.3±2.4***	0.8±0.2	8.2±0.9	0.2±0.3	18.5±2.2***

Values are means±SE. N, number of animals; CON, control group; SUS, suspension group.* and ***denote significant differences from control group at 0.05 and 0.001 levels, respectively.

3に懸垂期間中の各筋線維の占有率の変化を示した。懸垂期間を通して、typeIIA,IIBおよびIC線維の割合には両群間でほとんど差異は認められなかった。懸垂2週目以降SUS群でCON群より有意に高い“unclassified”線維の割合(p<0.001)と、有意に低いtypeI線維の割合(p<0.05)が認められ、4週目では両群間の差異はさらに増加した。

IV. 考 察

これまでの研究において、HCタイプが筋線維タイプを決定し^{5,24~26)}、さらに筋線維に含まれるHCタイプが筋の最大短縮速度と密接な関係にあること^{3,19)}が報告されてきている。これらのことは、収縮器官としての筋の本質的な特性を決定する上で、HCが非常に重要な因子であることを示すものである。したがって、懸垂によるヒラメ筋の速筋化の際に、HC組成がどのように変化するのかを観察することは非常に興味を持たれるところである。また、逆に、HC組成の変化が直接的に筋線維組成や収縮特性を変化させると考えられ得ることからも、懸垂中のHC組成を明確にしておく必要性が示唆される。

本研究の主要な発見は、後肢懸垂によりラットのヒラメ筋においてHCIIIdが発現したことである。懸垂によってヒラメ筋にHCIIIdが発現することを確認したのは本研究が初めてである。SDS-PAGEによる分析を用いたこれまでの研究では、成熟した正常なラットヒラメ筋にはHCIIIdは存在しないことが報告されている^{2,27)}。しかしながら、HCに反応するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的分析を行った研究では、正常なラットヒラメ筋でもHCIIId(X)が存在することが認められてい

る¹²⁾。電気泳動法と免疫組織化学的手法の両方を用いた最近の研究において、全サンプルの5%以上を構成するHCアイソフォームでないSDS-PAGEでは検出できない可能性が示されている¹⁴⁾ことから考えると、これらの違いは電気泳動法と免疫組織化学的手法との検出感度の違いによるものかもしれない。以上のことを考慮して、たとえ正常なヒラメ筋においてHCIIIdが存在するとしても、これまでの研究において、SDS-PAGEで検出不可能であったということは、HCIIIdが存在するとしても非常に微量であったことが示唆され、それが検出可能な程度まで増加したということは、まさしく懸垂の影響によるものであると考えられる。

それでは、懸垂によるどのような変化がHCIIIdを発現させたのであろうか。1つの可能性として考えられるのは、懸垂が持つ本質的な性質、すなわち“hypokinesia(運動活動量の減少)”と“hypodynamia(運動負荷の減少)”である。Alford et al.¹⁾は筋電図を用いた実験において、懸垂中のヒラメ筋の活動量は懸垂1週間後には懸垂前の値に戻ることを報告している。このことから、本研究で行った2週間、4週間といったより長期間の懸垂では“hypodynamia”がより強く影響している可能性が考えられる。

第2の可能性としては、神経インパルスパターンの変化が考えられる。この神経インパルスパターンの変化は、筋の収縮特性の変化と関係しており、同時に、収縮特性の面からもHCIIId発現の可能性が示唆される。Fischbach and Robbins⁹⁾は、ラットを用いた脚固定の実験において、固定によるヒラメ筋の収縮特性の速筋化の際に、神経イン

パルスパターンがより相動的なものへと変化したことを報告している。さらに、Lefmo¹⁵⁾の研究では、除神経のみを施したヒラメ筋よりも、除神経を施しさらに高頻度の電気刺激を行ったヒラメ筋の方がより大きな短縮速度を獲得したことが述べられている。このことから、彼は、不使用モデルによる収縮特性の速筋化は活動量の減少とともに、部分的にはインパルスパターンの変化によって生ずることを示唆している。最近の研究において、懸垂がラットヒラメ筋のインパルスパターンを緊張的なものからより相動的なものへと変化させることが示されていること²⁰⁾、Schiaffino et al.²¹⁾の研究において、除神経を施し高頻度のインパルスパターンの電気刺激を行った結果、ヒラメ筋に HClId(X) が発現したことが認められていること、さらに、HClId(X) から構成される typeIID(X) 線維の最大短縮速度は type I 線維よりも速く typeIIA 線維と同様な値を示すこと³⁾などから考えると、本研究においても、先行研究^{10,11,18)}で報告されているような最大短縮速度の増加が生じているとすれば、本研究で観察された HClId の発現は妥当性のあるものであり、この HClId の出現がヒラメ筋の速筋化に貢献している可能性は十分に考えられることである。

typeIID 線維は myosin ATPase 染色において typeIIB 線維と同様な染色パターンを呈することが報告されている^{12,22,31)}。したがって、HClId が増加した場合、本研究で用いた筋線維の分類法では typeIIB 線維が増加する可能性が考えられる。しかしながら、typeIIB 線維の明らかな増加は認められなかった。このことは、本研究で認められた HClId は、HClId のみで構成される筋線維を形成しているのではなく、他の HC アイソフォームとともに混在型筋線維を形成している可能性を示すものと考えられる。

HC アイソフォーム間の移行順序に関しては、最近の HClId または HCIX を観察した研究^{12,13,23,30,31)}において比較的一致した見解が得られており



という移行モデルが提唱されている。しかしながら、Gorza¹²⁾は、この移行モデルの他に、さらに、ラットのヒラメ筋においては HC I から HClId(X) への直接的な移行が存在する可能性を示唆してい

る。本研究の結果だけからでは HClId が HC I から移行したのか、HClIa から移行したのかを明示することはできず、この点に関してはこれからの検討課題としたい。

本研究における HC アイソフォーム、特に HClId の割合の変化を経時的に観察してみると、懸垂 1 週目から 2 週目にかけて HClId の割合が大きく増加していることがわかる。また、HClId が発現したラットの割合も、1 週目では 10 匹中 1 匹であったのに対し、2 週目では 9 匹中 7 匹と著しく増加した。さらに、筋線維組成でも、懸垂 1 週目から 2 週目にかけて大きく type I 線維が減少し“unclassified”線維が増加していることが認められる。先行研究において、1 週間の懸垂では fast ミオシンと slow ミオシンの相対的含有量に変化が認められなかったが、2 週間の懸垂では fast ミオシンの相対的含有量の増加が生じたことが報告されている²⁸⁾。これらのことから考えると、懸垂 1 週目から 2 週目の間に、筋の質的特性を大きく変化させるような臨界点のようなものが存在する可能性が示唆される。

組織化学的分析の結果、myosin ATPase 染色のどの pH 領域においても感受性を示さない“unclassified”線維が観察された。SUS 群と同時に同じ染色を行った CON 群のヒラメ筋ではこのような筋線維は認められなかったため、染色方法上の問題はなかったと考えられる。この筋線維がミオシンを含むか、含まないかについては明らかではないが、筋線維タイプが HC タイプを反映する^{5,24-26)}ことから考えると、この“unclassified”線維は type I 線維が変化したもののように思われる。また、先行研究では懸垂によりヒラメ筋においては fast HC¹⁸⁾ および速筋線維^{6,7,28,29)}の増加といった変化が認められているが、本研究ではそのような顕著な変化は観察されなかった。視覚的観察においてラットの後肢は常に地面から離れており、後肢の可動域において抵抗となる障害も存在しなかった。さらに、筋重量も先行研究^{8,11,18)}で観察された以上の割合で減少していることから懸垂方法上の問題はなかったと考えられる。先行研究と異なるこれらの結果に関しては、さらなる検討が必要になると思われる。

V. 総括

ラットの後肢懸垂がヒラメ筋のミオシン重鎖(HC)組成にどのような影響を及ぼすのかを経時的に捉え、組織化学的分析との比較を併せて検討することを目的とした。14週齢のWistar系雄性ラット53匹を後肢懸垂(SUS)群とコントロール(CON)群に分け、SUS群には1, 2および4週間の懸垂を負荷した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) CON群ではHC IとHCIIaのみが検出されたのに対し、SUS群では懸垂1週目よりHCII dが検出可能となり、その割合は懸垂期間の延長に伴い増加し、懸垂4週目ではCON群より有意な高値($p < 0.05$)を示した。また、SUS群におけるHCII dの割合およびHCII dが発現したラットの割合は、懸垂1週目から2週目にかけてより大きく増加する傾向が観察された。
- 2) 懸垂期間を通してtypeIIA, IIBおよびIC線維の割合は両群間で有意な差異は観察されなかった。SUS群においてtype I線維の減少と“unclassified”線維の増加が認められ、懸垂2週目以降のCON群との差異は有意($p < 0.05$)であった。

これらのことから、懸垂によってヒラメ筋においてHCII dが発現することが示された。また、懸垂1週目から2週目の間に、HCII dの発現および筋線維組成を大きく変化させるような臨界点が存在する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Alford EK, Roy RR, Hodgson JA and Edgerton VR (1987) : Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 96 : 635-649.
- 2) Bär A and Pette D (1988) : Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235 : 153-155.
- 3) Bottinelli R, Schiaffino S and Reggiani C (1991) : Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibers from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437 : 655-672.
- 4) Brooke MH and Kaiser KK (1970) : Muscle fiber types : how many and what kind? *Arch Neurol* 23 : 369-379.
- 5) Danielli Betto D, Zerbato E and Betto R (1986) : Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 138 : 981-987.
- 6) Desplanches D, Mayet MH, Sempore B and Flandrois R (1987) : Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol* 63 : 558-563.
- 7) Elder GCB and McComas AJ (1987) : Development of rat muscle during short- and long-term hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 62 : 1917-1923.
- 8) Fell RD, Bruce Gladden L, Steffen JM and Musacchia XJ (1985) : Fatigue and contraction of slow and fast muscles in hypokinetic/hypodynamic rats. *J Appl Physiol* 58 : 65-69.
- 9) Fischbach GD and Robbins N (1969) : Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J Physiol* 201 : 305-320.
- 10) Fitts RH, Metzger JM, Riley DA and Unsworth BR (1986) : Models of disuse : a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* 60 : 1946-1953.
- 11) Gardetto PR, Schluter JM and Fitts RH (1989) : Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 66 : 2739-2749.
- 12) 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.
- 13) Kirschbaum BJ, Kucher H-B, Termin A, Kelly AM and Pette D (1990) : Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin in rat fast-twitch muscle. *J Biol Chem* 265 : 13974-13980.
- 14) LaFramboise WA, Daood MJ, Guthrie RD, Schiaffino S, Moretti P, Brozanski B, Ontell MP, Butler-Browne GS, Whalen RG and Ontell M (1991) : Emergence of the mature myosin phenotype in the rat diaphragm muscle. *Dev Biol* 144 : 1-15.
- 15) Lømo T (1986) : Neural regulation of membrane and contractile properties of rat skeletal muscle. (Ed.) Saltin B (In) *Biochemistry of Exercise*. Vol. VI. Human Kinetics, Illinois, pp. 27-47.
- 16) Novikoff AF, Schin W and Drucker J (1961) : Mitochondrial localization of oxidation enzymes staining results with two tetrazolium

- salts. *J Biophys Biochem Cytol* 9 : 47-61.
- 17) Padykula HA and Herman H (1955) : The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 3 : 170-195.
 - 18) Reiser PJ, Kasper CE and Moss RL (1987) : Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscle. *J Appl Physiol* 63 : 2293-2300.
 - 19) Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG and Greaser ML (1985) : Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscle is correlates with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem* 260 : 9077-9080.
 - 20) Riley DA, Slocum GR, Bain JLW, Sedlak FR, Sowa TE and Mellender JW (1990) : Rat hindlimb unloading : soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J Appl Physiol* 69 : 58-66.
 - 21) Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Saggin L, Gundersen K and Lomo T (1988) : Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 134 : 575-576.
 - 22) Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K and Lomo T (1989) : Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Musc Res Cell Motility* 10 : 197-205.
 - 23) Schiaffino S, Saggin L, Viel A, Ausoni S, Sartore S and Gorza L (1986) : Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. (Ed.) Benzi G, Packer L, and Siliprandi N (In) *Biochemical Aspects of Physical Exercise*. Elsevier, Amsterdam, pp27-34.
 - 24) Staron RS and Pette D (1986) : Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86 : 19-23.
 - 25) Staron RS and Pette D (1987) : The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. *Biochem J* 243 : 695-699.
 - 26) Staron RS (1991) : Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96 : 21-24.
 - 27) Sugiura T and 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.
 - 28) Templeton GH, Padalino M, Manton J, Glasderg M, Silver CJ, Silver P, DeMartino G, Leconey T, Klug G, Hagler H and Sutko JL (1984) : Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 56 : 278-286.
 - 29) Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M and Dudenhoefter GA (1988) : Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 65 : 1191-1195.
 - 30) Termin A, Staron RS and Pette D (1989) : Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles : a single-fiber study. *Eur J Biochem* 186 : 749-754.
 - 31) Termin A, Staron RS and Pette D (1989) : Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92 : 453-457.
 - 32) Thomason DB, Herrick RE and Baldwin KM (1987) : Activity influences on soleus muscle myosin during rodent hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 63 : 138-144.
 - 33) Thomason DB, Herrick RE, Surdyka D and Baldwin KM (1987) : Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J Appl Physiol* 63 : 130-137.
 - 34) Tsika RW, Herrick RE and Baldwin KM (1987) : Effect of anabolic steroids on skeletal muscle mass during hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 63 : 2122-2127.