

4章．選択交配法による筋線維組成の親から子への遺伝性についての検討（実験I）

1．目的

ヒトにおいては，双生児を用いて筋線維組成の遺伝性についての報告がいくつかなされている．Komiら（1977）は%type I線維はほぼ先天的に決定されるとしているが，Bouchardら（1986）はKomiら（1977）の方法を模倣した研究により，筋線維組成には先天的影響がないことを報告している．近年では，Simoneauら（1995）がいくつかの双生児研究のデータをまとめ，筋線維組成のばらつきのうちの約45%が先天的に決定されているとしている．しかしながら，これらの双生児を用いた研究は後天的影響の受けにくさを示すものであり，親から子への遺伝性は示されていない．

親から子への遺伝性を調べるためには数世代にわたって調べていく必要があるが，ヒトをモデルとした場合は実験が非常に困難であり，動物実験に頼らざるを得ない．ラットを用いた研究としては，Nakamuraら（1993）は4世代，勝田ら（1991）は7世代にわたって腓腹筋外側頭深層部の%type I線維の高いラットの選択交配を行い，実現の遺伝率としてそれぞれ0.17，0.20を算出している．これらの結果は親の集団の筋線維組成のばらつきの約17-20%が子の集団の筋線維組成のばらつきに影響を及ぼすことを意味している．しかしながら，選択交配法ではある方向へ選択を行った場合とその逆方向へ選択を行った場合とでは反応が異なる場合があるため（Falconer 1993），筋線維組成の遺伝性を明確にするためには%type II線維についても選択交配実験を行う必要がある．

筋線維組成はパフォーマンスを規定する要因の一つと考えられているが、ある筋の筋線維組成がその種目に適したものであっても、他の筋が適した筋線維組成ではなかった場合、パフォーマンスにはあまり反映されないのではないかと考えられる。よって、個体内で筋間の筋線維組成に遺伝的な関連性が存在するのかどうかは興味深い問題である。しかし、ある筋の筋線維組成の遺伝的影響が他の筋におよんでいるのかは不明である。

本研究では、ラットの腓腹筋外側頭深層部の%type II線維の高いラットの選択交配を7世代にわたって行い、%type II線維が親から子へどの程度受け継がれるのかについて調べた。また、この時に共同筋であるヒラメ筋の筋線維組成の変化を追い、ある筋でみられた表現型の世代変化が他の筋でもみられるのかについて検討した。

2. 方法

(1) 実験動物

本研究では、集団に多様な遺伝子を保有させるため、祖父母世代として異なる3系統のラット（Wistar-Imamichi 雌6匹雄2匹，Donryu 雌6匹雄2匹，Fischer344 雌6匹雄2匹）を購入し、実験動物とした。

(2) 飼育方法

飼育は12時間サイクルの照明下、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ に常時維持された飼育室において、オガクズを敷いたプラスチックのケース（夏目製作所製，ポリカーボネイトラットケージKN-602， $35\text{cm}\times 30\text{cm}\times 17\text{cm}$ ）で行った。水と飼料（オリエンタル酵母工業製，実験動物用固形飼料

MF) は自由摂取とした。また、基礎集団以降の各世代は、発育状態の指標として9週齢時に体重を測定した。

(3) 手術と組織化学的分析

解剖はペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg body wt ip) で腓腹筋とヒラメ筋を摘出した。その後の交配が可能となるよう、筋摘出後速やかに縫合した。摘出された筋は厚さ数mmに横断し、クリオスタット (ブライト社製 OT-FAS) により厚さ10 μ mの横断切片を作成した。これらの切片にPadykulaとHerman (1955) の方法によりMyosin ATPase染色 preincubation pH10.3を施し、%type II線維を算出した。なお、腓腹筋については外側頭深層部を分析部位とし、腓腹筋は250本以上、ヒラメ筋は500本以上を分析に用いた。

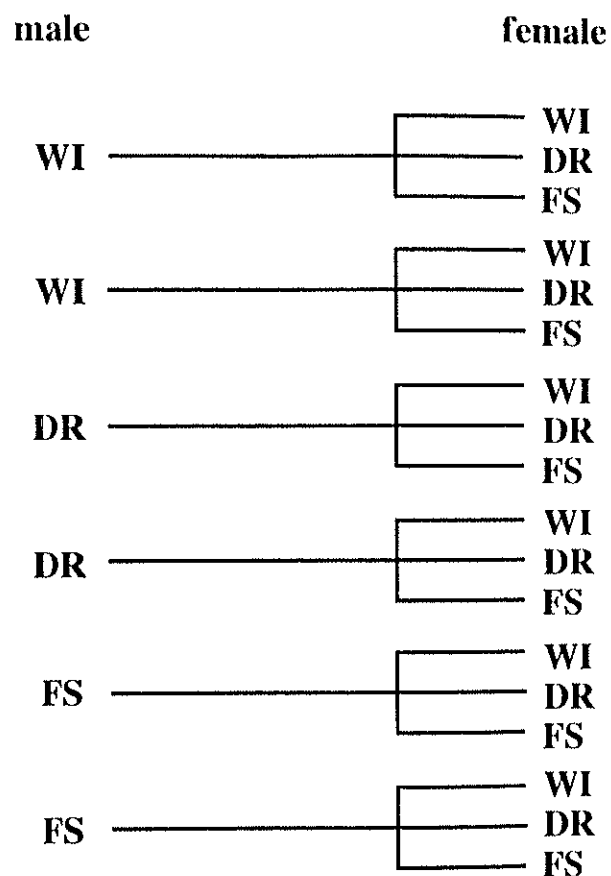
(4) 祖父母世代の交配, 妊娠, 出産

祖父母世代は11週齢時に図1に示す組み合わせで、各ケージにつき雄ラット1匹に対し雌ラット3匹の割合で交配した。ラットの妊娠期間は約3週間であるため、交配後3週間に達する2-3日前に雄ラットと雌ラットを分離し、その後雌ラットは1匹ずつ個別のケージで飼育した。

雄ラットは分離後1週間以内に手術を行った。雌ラットは出産後、3週間は授乳期間として子と共に同一ケージ内で飼育した。

(5) 基礎集団の作成

祖父母世代の交配によって生まれた子を基礎集団 (G0) とした。G0は離乳時に雄雌を分け、祖父母世代と同一の条件下で飼育した。9週齢時に解剖を行い、%type II線維を算出した。



WI:Wistar-Imamichi
DR:Donryu
FS:Fischer344

Figure 1. Pairing of the base population.

(6) 選択交配 (選択交配群)

G0が11週齢に達した時点で、腓腹筋の%type II線維が高い順に原則として雄5匹，雌10匹を抽出し，雄1匹に雌2匹の割合で交配した。なお，このとき兄妹交配は避けるようにした。ラットの妊娠期間は約3週間であるので14-15週齢時に出産があり，この子を選択交配群第1世代 (GIS) とした。これらは3週齢時に離乳して雄雌別々に飼育し，9週齢時に解剖を行い筋線維組成を算出した。以後，これと同様な方法によって第7世代 (G7S) の%type II線維の算出までを行った。図2に実験プロトコールを示す。

(7) ランダム交配 (対照群)

選択交配群と同一の遺伝子集団を得るため，G0のうち，選択交配のために抽出されたラットをもう一度元の集団に戻してやり，乱数表を用いてランダムに雄5匹雌10匹を抽出し，雄1匹に対し雌2匹を交配し，得られた子を対照群第1世代 (G1C) とした。以後，選択交配群と同様なサイクルでランダム交配を行い，第7世代 (G7C) までの%type II線維の算出を行った (図2)。

なお，このランダム交配が行われた集団を対照群とした。

(8) 実現の遺伝率

量的形質の遺伝性を数値化する方法として遺伝率を求める方法がある。Falconer (1993) は遺伝率を広義の遺伝率 (H^2B) と狭義の遺伝率 (H^2N) の二つに分類している。 H^2B は表現型分散 (VP) に対して遺伝子型分散 (VG) と環境分散 (VE) がそれぞれどの程度影響をおよぼしているのかを示すものである。したがって表現型分散は先天的影響と後天的影響

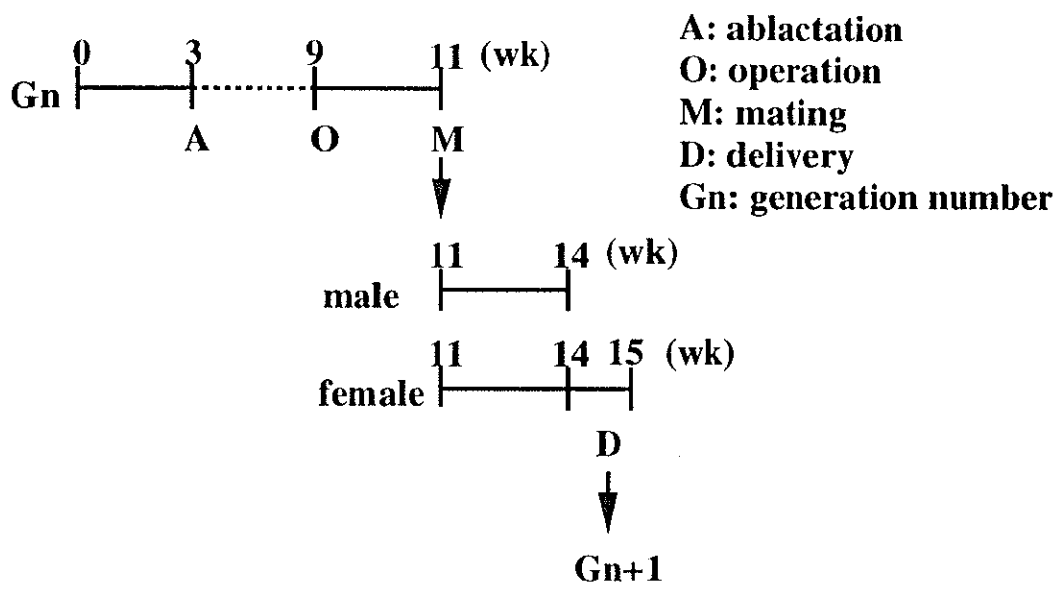


Figure 2. Experimental protocol.

による分散として表すことができる。

$$VP=VG+VE$$

したがって、広義の遺伝率の H^2B は次式で表される。

$$H^2B=VG/VP$$

さらに、 VG は相加的遺伝分散（ VA ：形質に影響をおよぼす遺伝子群の相加的効果の分散であり、次世代に伝わると考えられる）、優性分散（ VD ：対立遺伝子がヘテロである場合に生じる優性効果の分散）、相互作用分散（ VI ：形質に影響をおよぼす複数の遺伝子間の相互作用の分散）の3つに分けることができる。

$$VG=VA+VD+VI$$

H^2N は表現型が親から受け継がれた遺伝子群によってどれだけ決定されるかを示す値であり、次式で示される。

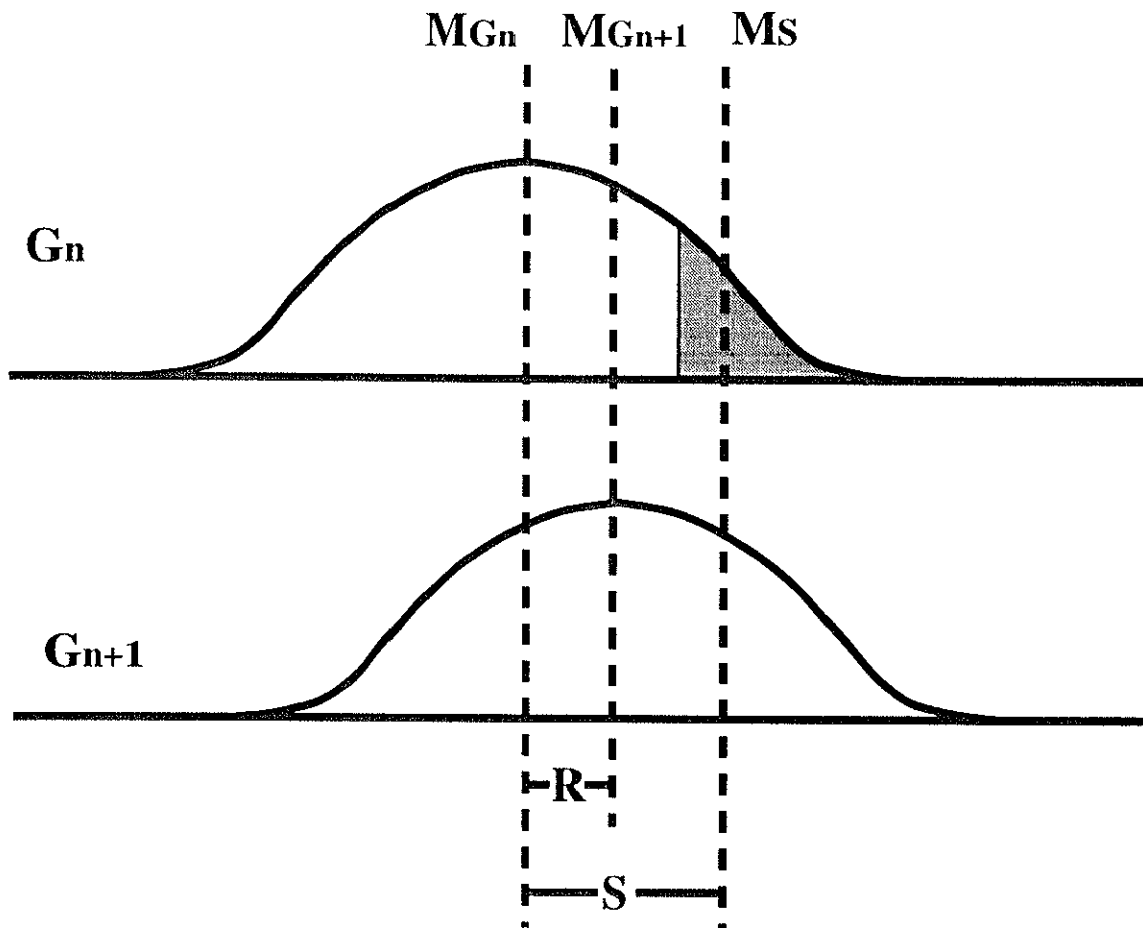
$$H^2N=VA/VP$$

H^2N の算出方法はいくつか知られているが、このうち選択交配により得られたものを実現の遺伝率といい、集団の平均値の変化から算出する。図3に実現の遺伝率の算出方法を示した。実現の遺伝率は選択反応（ R ）を選択差（ S ）で除することによって示される。選択交配が繰り返し行われた場合はより正確な値を得るため選択反応と累積選択差の回帰によって示される（Falconer 1993）。本研究では腓腹筋の%type II線維について、7世代の選択交配による実現の遺伝率を算出した。

(9) 統計的検討

(i) 体重および%type II線維の平均値の変化

雄雌別体重、腓腹筋およびヒラメ筋の%type II線維について、各世代での選択交配群と対照群の間で、また基礎集団と各世代との間で平均値



G_n : population before selection
 G_{n+1} : population after selection
 M_{G_n} : mean value of G_n
 $M_{G_{n+1}}$: mean value of G_{n+1}
 M_S : mean value of selected group
 R : response to selection
 S : selection differential
 H : realized heritability

$$H = \frac{R}{S}$$

Figure 3. Estimation of realized heritability.

の差の検定を行った。検定の方法は、2元配置の分散分析（群×世代）により有意差が認められた場合にScheffe's post-hoc testを用いた。有意水準は5%とした。

(ii) 腓腹筋とヒラメ筋の%type II線維の関連性について

基礎集団以降の各世代において、各個体の腓腹筋とヒラメ筋の%type II線維の相関関係について検討した。有意水準は5%とした。

3. 結果

(1) 体重

表1に対照群、群選択交配群の9週齢時の体重を雄雌別に示した。G7Sの雄およびG5, 6, 7Sの雌は基礎集団に比べて有意に低値を示した。また、G6, 7Sの雄およびG7Sの雌は同世代の対照群より有意に低値を示した。対照群では変化は見られなかった。

(2) 腓腹筋 %type II線維の変化

図4 AにG7Cの、図4 BにG7Sの腓腹筋のmyosinATPase染色の組織像を示した。この2つの写真を比較すると、G7Sの方が黒く染色されているtype II線維の割合が高いことが特徴的であった。図5に腓腹筋の%type II線維の第7世代までの変化を示した。腓腹筋では、G4, 5, 6, 7Sは基礎集団に比べて有意に高値を示し、G3, 5, 6, 7Sは同世代の対照群に比べて有意に高値を示した。対照群では変化は見られなかった。

(3) 実現の遺伝率

G0からG7Sにかけての1世代毎の%type II線維の実現の遺伝率はそれ

Table 1. Body mass in generations of base population (G0), control line (G1-7C) and selected line (G1-7S)

generation	male		female	
	number	mean±S.D.	number	mean±S.D.
G0	32	259.9±54.8	14	199.6±38.7
G1C	43	264.9±34.1	47	195.5±24.3
G1S	38	278.2±60.4	43	211.3±29.6
G2C	48	282.6±32.1	56	188.6±16.8
G2S	53	260.9±47.7	50	177.2±24.0
G3C	53	266.9±30.8	33	192.2±13.6
G3S	53	272.6±24.4	54	186.5±16.8
G4C	26	250.0±22.5	34	176.1±16.6
G4S	35	215.6±41.9	39	162.6±16.1 *
G5C	27	263.0±37.4	34	184.0±19.4
G5S	41	238.2±41.6	28	173.0±26.3
G6C	35	264.5±24.7	36	174.4±14.8
G6S	36	215.4±45.3 †	49	160.0±31.1 *
G7C	39	270.1±32.8	51	181.7±18.8
G7S	38	203.2±44.2 †*	20	141.8±30.0 †*

†:Significantly different from control line (P<0.05).

*:Significantly different from G0 (P<0.05).

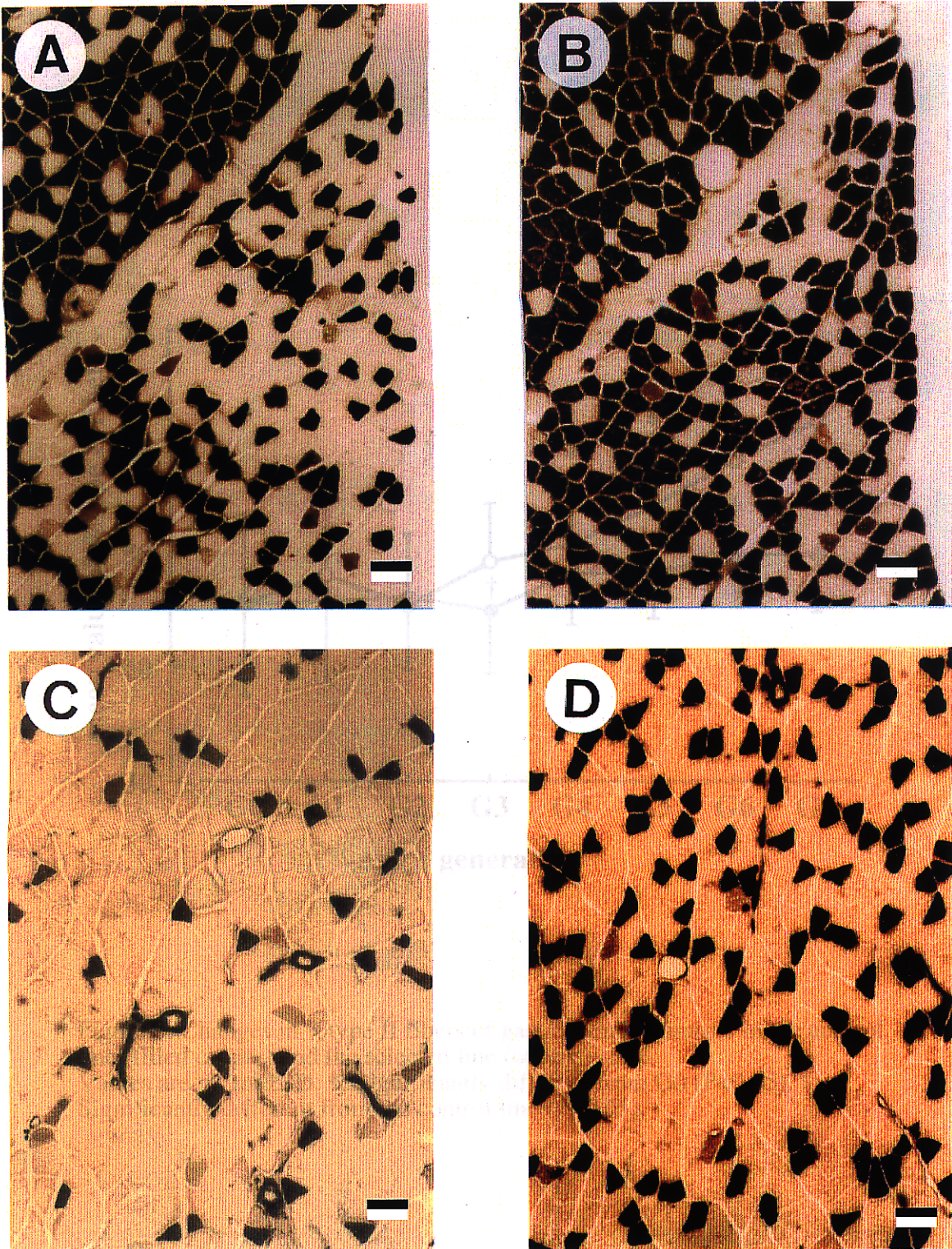


Figure 4. Transverse sections of gastrocnemius and soleus muscles of rats in G7. The sections were stained for ATPase activity after preincubation at pH 10.3. Light and dark fibers on the muscle sections are type I and type II fibers, respectively. A: gastrocnemius in G7C. B: gastrocnemius in G7S. C: soleus in G7C. D: soleus in G7S. Bar, 100 μ m.

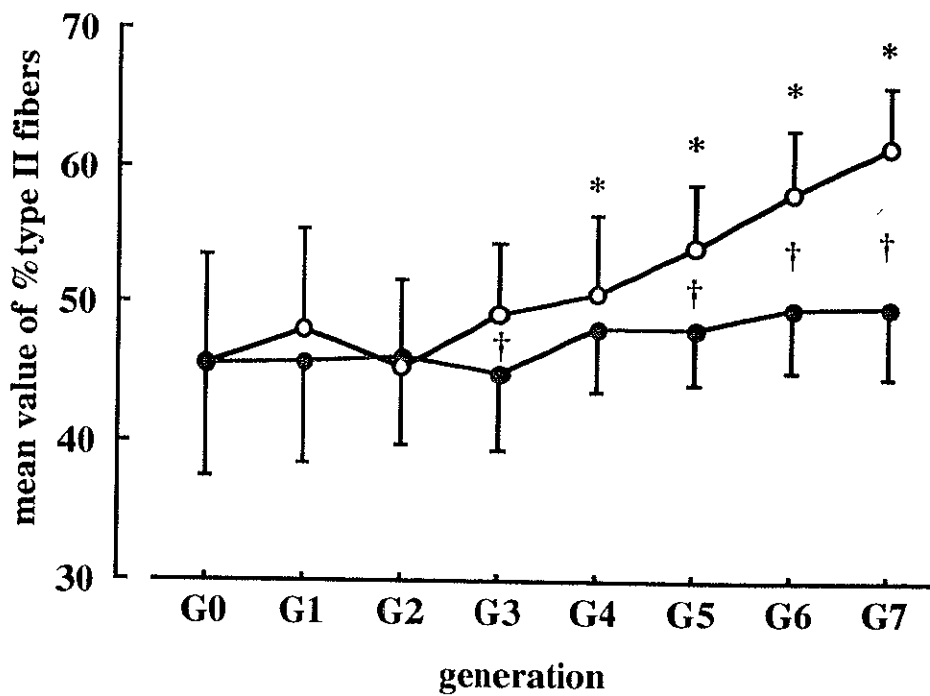


Figure 5. Changes in %type II fibers of gastrocnemius muscle in the control line (filled circles) and the selected line (open circles). Values are means \pm SD. *: Significantly different from G0 (P<0.05). †: Significantly different from the control line (P<0.05).

ぞれ0.21, -0.10, 0.57, 0.20, 0.40, 0.75, 0.53であった。また, G0からG7Sにかけての実現の遺伝率を図6に示した。回帰直線の傾きによって示された実現の遺伝率は0.29であり, この傾きは $y = 0$ とは有意に異なるものであった ($P < 0.01$)。

(4) ヒラメ筋 %type II線維の変化

図4 CにG7Cの, 図4 DにG7Sのヒラメ筋のmyosinATPase染色の写真を示した。この2つの写真を比較すると, G7Sの方が黒く染色されているtype II線維の割合が高いことが特徴的であった。図7にヒラメ筋の%type II線維の変化を示した。ヒラメ筋では, G3, 4, 5, 6, 7Sは基礎集団と比較して有意に高値を示し, G3, 5, 7Sは同世代の対照群と比較して有意に高値を示した。対照群では変化は見られなかった。

(5) 腓腹筋とヒラメ筋の%type II線維の関係

表2は基礎集団と選択交配群, 対照群, および各世代の両群について, 腓腹筋とヒラメ筋の%type II線維の相関係数について示したものである。いずれにおいても相関係数は正であり, 両群ではG1以降のすべての世代において有意であった。また世代進行にともなう相関係数の増加傾向が見られた。

4. 考察

本研究では, 腓腹筋外側頭深層部の%type II線維が高いラットの選択交配およびランダム交配を行い, 親の筋線維組成が子にどの程度影響をおよぼすのかを調べた。また, 腓腹筋の%type II線維で選択交配を行っ

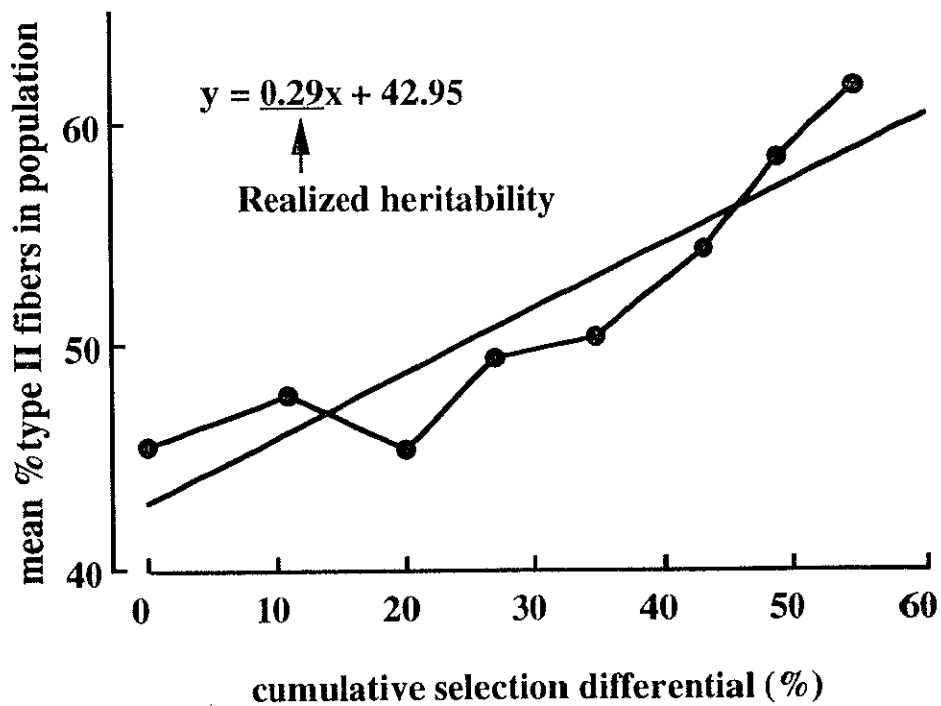


Figure 6. Realized heritability of %type II fibers in the gastrocnemius muscle in seven generations. Each point represents the mean value of the selected generations (G0-G7S). The slope of regression line shows the realized heritability in seven generations. Regression coefficient is 0.29 which is the realized heritability of %type II fibers.

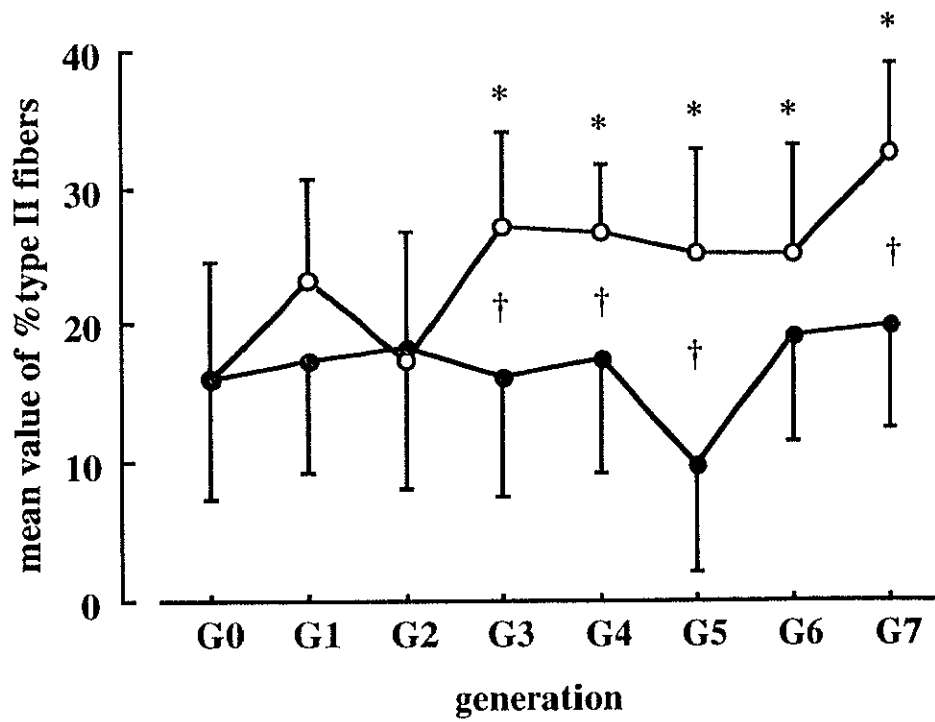


Figure 7. Changes in %type II fibers of soleus muscle in the control line (filled circles) and the selected line (open circles). Values are means \pm SD. *: Significantly different from G0 (P<0.05). †: Significantly different from the control line (P<0.05).

Table 2. Correlation coefficients between %type II fibers in gastrocnemius and soleus muscles in each generation

Generation	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Selected line		0.13	0.13	0.09	0.06	0.31 *	0.45 *	0.54 *
Control line		0.24 *	0.19	0.13	0.29 *	0.12	0.19	0.43 *
Both	0.16	0.22 *	0.16 *	0.30 *	0.27 *	0.53 *	0.46 *	0.73 *

*: Significant at $P < 0.05$.

たときに共同筋であるヒラメ筋の%type II線維に相関した反応が見られるかについても検討した。

7世代にわたる交配の結果、体重は雄雌とも選択交配群で有意な減少が見られた（表1）。この%type II線維の変化は体重の減少にともなって生じたものではないと考えられる。なぜなら、Nakamuraら（1993）は腓腹筋外側頭深層部の%type I線維の高い個体についての選択交配、すなわち本研究とは逆方向への選択交配を4世代にわたって行った時に%type I線維の増加と同時に有意な体重の減少を観察しているからである。また、Yamaguchiら（1993）は同一週齢のラットのヒラメ筋の筋線維組成には体重の影響がないことを報告している。これまで、哺乳動物において近交弱勢による体重の減少が報告されているため（Bereskin et al. 1968, White 1972）、この体重の減少は選択交配による近交弱勢に起因するものと思われる。実際G2, 3, 6, 7において選択交配群が対照群に比べて有意に高い近交係数を示し（ $P < 0.05$, 未発表資料）、特にG7ではその差が大きかった（ 33.1 ± 3.9 vs. 19.8 ± 2.4 , 選択交配群 vs. 対照群）。これらのことから、%type II線維の変化は体重の変化とは無関係であると思われる。

本実験では遺伝的浮動などの偶然的要因や環境要因をできる限り除外するため、ランダム交配による対照群をもうけた。選択交配群は遺伝的要因、偶然的要因、環境要因の影響をすべて受けるが、対照群では遺伝的要因による変化は生じないと考えられる。腓腹筋の%type II線維は選択交配群では対照群に対しても基礎集団に対しても有意に高値を示したが対照群では変化は見られなかった（図4）。よって選択交配群では主に遺伝的要因により%type II線維が増加していったものと考えられる。

本実験から得られた7世代の選択交配による腓腹筋の%type II線維の

実現の遺伝率は0.29であった(図5)。これは、親の%type II線維のばらつきのうちの約29%が子に伝えられることを示している。一方、Nakamuraら(1993)は腓腹筋の%type I線維についての実現の遺伝率は0.17であったと報告している。両者の値には有意な差はなく(未発表資料)、親の筋線維組成が子に与える影響は速筋方向でも遅筋方向でも差がないことが示唆された。おそらく、筋線維組成のばらつきのうち約10-30%は親の筋線維組成に影響され、残りの約70-90%は優性分散や相互作用分散、および環境分散によって決定されるものと思われる。これまで、様々な量的形質についての実現の遺伝率が算出されており、その範囲は0.1-0.7程度となっている(Cohan et al. 1989, Dijken and scharloo 1979, Singh and Pandey 1993, Weber 1990, Yoong and Wong 1988)。このことから、筋線維組成の実現の遺伝率は比較的低いのではないかと考えられる。

Nimmoら(1985)はマウスの筋線維組成の広義の遺伝率として70-80%の値を得ている。ラットとマウスの筋線維組成決定のメカニズムが同じであるかどうかは明らかではないが、もし同じだとすれば筋線維組成の広義の遺伝率と狭義の遺伝率との間には大きな差があるように見える。このことから、筋線維組成のばらつきに与える優性分散や相互作用分散の影響が大きいのではないかとと思われる。実際、Nimmoら(1985)はマウスの筋線維組成に有意な優性分散が存在することを示している。よって、ラットにおいても高い広義の遺伝率が得られるのかもしれない。

本研究では腓腹筋外側頭深層部の%type II線維が高いラットの選択交配を行ったところ、面白いことに腓腹筋の%type II線維の増加にともない選択交配とは無関係なはずのヒラメ筋の%type II線維までもが増加していった(図5, 7)。加えて、両者をまとめた場合GI以降のすべて

の世代で両筋の間に有意な正の相関関係が得られた（表2）。これらのことから、腓腹筋とヒラメ筋の筋線維組成の決定には何らかの関連性があると考えられる。このメカニズムに関しては2つの仮説が考えられる。

1つは、多面発現である。多面発現とは、本研究の場合では腓腹筋の筋線維組成を決定する遺伝子群のうちの一つがヒラメ筋の筋線維組成にも影響をおよぼしていることを意味する。もう1つは、腓腹筋の筋線維組成決定に働く遺伝子とヒラメ筋の筋線維組成決定遺伝子の一部が染色体上で連鎖しているということである。しかし、一般に相関反応の原因は主に多面発現であるといわれる（Falconer 1993）。今後、共同筋以外に拮抗筋やあるいは全身での他の部位の筋の筋線維組成との関連性についての検討が期待される。また、このような相関反応を生じさせる要因について調べていき、遺伝的側面での筋線維組成決定のメカニズムについて検討することが必要であると思われる。

結論として、親の集団の腓腹筋外側頭深層部の%type II線維のばらつきの中の約29%が子の集団に受け継がれ、また、この遺伝的影響はヒラメ筋にまでおよんでいた。今後、ヒラメ筋以外の筋についても同様なことが起こっているのかについて、おおよびどのような因子が筋線維組成の遺伝性を引き起こしているのかについて検討する必要性がある。

5. 要約

筋線維組成の親から子への遺伝性について調べるため、腓腹筋外側頭深層部の%type II線維の高いラットの7世代の選択交配を行った。さらに、腓腹筋での遺伝的影響がヒラメ筋にまでおよんでいるのかについても調べた。得られた結果は以下の通りである。

- (1) 選択交配により腓腹筋外側頭深層部の%type II線維は増加していった。
- (2) %type II線維の実現の遺伝率として0.29の値が得られた。
- (3) 選択交配とは無関係なはずのヒラメ筋でも%type II線維が増加し、いくつかの世代では腓腹筋外側頭深層部と有意な正の相関関係がみられた。

以上のことから、ラットの腓腹筋外側頭深層部の%type II線維には親から子への遺伝的影響が存在し、また、腓腹筋とヒラメ筋の筋線維組成には関連性が存在することが示唆された。