ラット尾部宙づりによるヒラメ筋線維組成およびミオシン重鎖の変化

大石 康 晴¹⁾²⁾ 山 川 孝^{2)*} 宮 本 英 七²⁾

Changes in fiber type composition and myosin heavy chain isoform in rat soleus muscles following hindlimb suspension

Yasuharu Oishi^{1,2}, Takashi Yamakawa^{2*} and Eishichi Miyamoto²

Abstract

We investigated the changes in fiber type composition and myosin heavy chain isoform in rat soleus muscles during 7-week hindlimb suspension. In the soleus muscles, a significant reduction of the muscle weight was observed after 3-week suspension, and the muscle fiber atrophy was found in both slow-twitch oxidative (SO) and fast-twitch oxidative glycolytic (FOG) fibers. This indicates that the decrease in the muscle weight was caused by the atrophy of both SO and FOG fibers. As for the fiber type composition, the percentage of FOG fibers increased in the soleus muscles after 3-week suspension, and concomitantly an increase in the fast type of myosin heavy chain isoform was also observed. These results suggest that the increase in the percentage of FOG fibers in the soleus muscles during hindlimb suspension was caused by the conversion from SO to FOG fibers, it is also suggested that the increase in FOG fibers reflected that of fast type of myosin heavy chain isoform. The speeding of the soleus muscles following hindlimb suspension was considered from both tissue level by histochemical analysis and molecular level by SDS-PAGE and immunobiochemical analysis.

Key words: fiber type composition, myosin heavy chain, hindlimb suspension, SDS-PAGE, immunoblotting

(Japan J. Phys. Educ., 37: 365—374, March, 1993.)

キーワード：筋線維組成，ミオシン重鎖，尾部宙づり，
SDS-PAGE，イムノブロッティング

I. 緒 言

骨格筋の廃用性萎縮実験モデルとしては、ラットやハムスターを用いた尾部宙づり実験または全身の宙づり実験が挙げられる。このような実験モデルは、無重力状態を模倣したモデルと考えられ、重力の除去あるいは軽減による筋への影響が検討されている。宙づりモデルの影

響を筋のサイズでみた場合、速筋線維よりも遅筋線維の萎縮率が大きく、その結果、遅筋線維占有率の高いヒラメ筋では筋重量の低下が顕著となり¹⁵⁾、速筋線維占有率の高い筋ではその影響は比較的小さい²⁴⁾。また、筋の収縮特性への影響をみた場合、ヒラメ筋で収縮時間および弛緩時間の短縮が認められ³⁰⁾、ヒラメ筋の速筋化が報告されている。このことは、組織化学的分析により筋線維組成の変化を検討したとき、収縮速度の速い速筋線維の占有率が増加したことか

1) 熊本大学教養部保健体育科教室

〒860 熊本市黒髪2-40-1

2) 熊本大学医学部薬理学教室

〒860 熊本市本荘2-2-1

* 現住所：北海道千歳市梅ヶ丘，梅ヶ丘クリニック

1. Department of Physical Education, Faculty of General Education, Kumamoto University. 2-40-1 Kurokami, Kumamoto-city, Kumamoto (860)

2. Department of Pharmacology, Kumamoto University Medical School. 2-2-1 Honjo, Kumamoto-city, Kumamoto (860)

らも推察される^{9,13)}。

骨格筋線維の収縮速度はミオシンの ATPase (ATP 加水分解酵素) 活性により規定され²⁾, 筋線維は, この ATPase 活性の pH 依存性の差に基づき, 組織化学的に遅筋線維といくつかのサブタイプを持つ速筋線維に分類される。速筋線維は, 遅筋線維と比較して収縮速度が速く, ATPase 活性が高い特性を有している。また, 生化学的分析により, 収縮速度を決定するミオシンの ATPase はミオシン分子の重鎖 (myosin heavy chain: HC) 部分に含有されることが報告²⁷⁾されている。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた研究から, このミオシン重鎖には遅筋型 (HC-I) と速筋型 (HC-IIa, HC-IIb) の分子種 (アイソフォーム) が存在し, 遅筋線維である Type I 線維には HC-I が, 速筋線維の Type IIa, Type IIb の各線維にはそれぞれ HC-IIa, HC-IIb が特異的に含まれる^{3,7,21)}。さらに, 速筋型のタイプのアイソフォーム (HC-IIa, HC-IIb) 含有量が高い筋線維ほど収縮速度が速いことが報告されている²³⁾。したがって, 組織化学的に分類される速筋線維と遅筋線維では, 蛋白レベルにおいてミオシン重鎖アイソフォームが異なっており, これが筋線維の収縮特性を規定していると考えられる。そこで宙づりにより認められるヒラメ筋の収縮速度の変化や速筋線維占有率の増加を, 筋細胞内の蛋白レベルにおけるミオシン重鎖アイソフォームの変化の観点から検討することは意義深いと思われる。

本研究はラット尾部宙づりによるヒラメ筋の変化を, 組織レベルでは筋線維組成の変化, 蛋白レベルではミオシン重鎖アイソフォームの変化からそれぞれ分析し, 各々のレベルにおける変化の様態, およびその関連性について検討した。従来, ミオシン重鎖分析には SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法が用いられてきたが, アイソフォームの分子量が近似しているため分離には手法上の困難さが伴ってきた。本研究では, ミオシン重鎖分析のための新しい手法として, 速筋型タイプのミオシン重鎖のみを認

識するモノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用したイムノブロットング法により免疫学的分析を行った。

II. 方 法

実験には生後 13 週齢のウイスター系雄性ラット 42 匹を用い, 各 21 匹をコントロール群と宙づり群とした。宙づりは Morey¹⁸⁾の方法にしたがい, 尾部を上方に引き上げ後肢を中空に浮かせることにより行った。この方法では, ラットは前肢を使って 360 度動くことが可能である。なお餌と水は両群とも自由摂取とした。7 週間の実験期間中, 各週毎に両群より 3 匹ずつを分析に供し, 被検筋として左右ヒラメ筋を用いた。

1. 組織化学的分析

組織化学的分析には左脚ヒラメ筋を用いた。エーテル麻酔の後筋を取り出し, 筋重量を測定した後, 約 5 mm の厚さで筋腹付近を切り出し, これをコンパウンド内に埋め液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結した。-20°C の環境下でマイクロトームを用いて厚さ約 10 μ m の連続切片を作成した。これらの連続切片にミオシン ATPase 染色²⁰⁾および NADH-TR 染色¹⁹⁾を施し, Peter et al.²²⁾の分類に従い, 筋線維を SO (slow-twitch oxidative) 線維と FOG (fast-twitch oxidative glycolytic) 線維に分け, 平均 816 本の筋線維を用いて筋線維組成を求めた。また, それぞれの筋線維約 40 本ずつについて, コンピューター (MZ-80 Z) に接続したデジタイザー (MITABLET-II, KD 8030) を用いて横断面積を算出した。

2. ミオシン重鎖分析

ミオシン重鎖分析には右脚ヒラメ筋を用いた。ヒラメ筋重量を測定し, その 9 倍量のトリスバッファー溶液 (10 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.5) でホモジネートし, Bradford⁵⁾の方法に従って蛋白定量を行い, 2.5 μ g の蛋白を電気泳動に供した。電気泳動は, Laemmli¹⁶⁾の方法により, 5%濃縮ゲル, 7%ランニング

ゲルを用いて、30 mA で約 3 時間の SDS-ポリ
アクリルアミドゲル電気泳動（以下 SDS-
PAGE と略す）を行った後、Towbin et al.³⁴⁾の
方法に従いトランスブロットシステムにより泳
動ゲル内の蛋白をミリポアーメンブレン（ミリ
ポアーフィルター, GVHP 000-10）に転移した
（50 V, 16–20 h）。転移後、速筋型ミオシン重鎖
に対するモノクローナル抗体を用いたイムノブ
ロッキングを行い、速筋型ミオシン重鎖のバ
ンドを免疫染色した。すなわち、このメンブ
レンを室温で 1 時間、ウシ血清アルブミン溶液
（2.5% Bovine serum albumin, SIGMA A-
2153, 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5）
に浸し、抗体の非特異的結合部位をブロックし
た後、室温で 1 時間、1 次抗体としてマウスの
モノクローナル抗ミオシン速筋型重鎖抗体
（monoclonal anti-myosin, fast skeletal anti-
body, SIGMA, M-4276）と反応させ、さらに
2 次抗体としてビオチン化抗マウス抗体
（Vectastain ABC kit, VEC K-4002）と室温で
30 分間反応させた。各反応の間にメンブレンを
TTBS 溶液（0.1 M Tris-HCl, 0.9% NaCl,
0.1% Tween 20, pH 7.5）で洗浄し、余分な抗
体を除去した。メンブレンに転移された速筋型

ミオシン重鎖のバンドは、ジアミノベンチジン
（3,3'-diaminobenzidine, SIGMA D-5637）を基
質として、アビジン—ビオチン—ペルオキシ
ダーゼ複合体法（Vecta-stain ABC kit, VEC
K-4002）により免疫染色した。

3. 統計処理

各群の平均値の差の検定は、student t-test に
より行い、5 % 未満の危険率を有意水準とした。

III. 結 果

1. 筋重量の減少および筋線維萎縮

Fig. 1 に実験期間中の各週におけるコント
ロール群と宙づり群のラットヒラメ筋の平均筋
重量を示した。コントロール群では、時間経過
とともに 6 週間目まで筋重量はわずかに増加し
た。宙づり群では、2 週目までは筋重量の変化
を認めなかったものの、3 週目以降より 7 週目
まで筋重量の顕著な減少が認められた。その低
下率は 45.5–68.0% を示し、コントロール群に
比ベ有意に低値であった。Fig. 2 には各週ごと
の両群ヒラメ筋の SO 線維と FOG 線維の横断
面積を示した。宙づり群では、宙づり 2 週目ま
では、測定値の変動が大きくコントロール群と
の差はみられなかったが、3 週目以降より両線

Fig. 1. Changes in muscle weight in control (○) and suspension (△) groups.
Values are means $\pm$ SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01 compared with control.

維ともにコントロール群に対し横断面積の有意な減少を示した。宙づり群の両筋線維の萎縮率を比較すると、宙づり3週目より7週目までのSO線維の萎縮率は56.7—72.2%であり、一方FOG線維では、41.8—60.5%の萎縮率を示した。実験期間を通して両線維の萎縮過程、および筋重量の減少と筋線維横断面積の減少は類似した経時的变化を示し、本実験モデルにおいて、宙づり3週目以降に確実にヒラメ筋の廃用性萎縮が生じることを示した。

2. 筋線維組成

コントロール群と宙づり群の筋線維組成の経

時的变化を Table 1 に示した。両群ともにヒラメ筋はSO線維とFOG線維から構成されており、コントロール群では実験の全過程を通してFOG線維は数%しか認められなかった。これに対して宙づり群では、2週目までは筋線維組成に有意な変化は認められなかったが、3週目以降ほぼ全てのヒラメ筋においてFOG線維の占有率は10%を越え、宙づりによるFOG線維占有率の顕著な増加がみられた。これは、ラット尾部宙づりによりヒラメ筋の筋線維全体が萎縮する一方でFOG線維の割合が増加し、筋の収縮機能の観点からはヒラメ筋が速筋化したこと

Fig. 2. Changes in muscle fiber area in control and suspension groups. ○: control SO fibers, △: control FOG fibers, ●: suspended SO fibers, ▲: suspended FOG fibers. Values are means±SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01 compared with control.

Table 1. Fiber type composition of soleus in control and suspension groups (%).

Exp. period	1 wk.	2 wk.	3 wk.	4 wk.	5 wk.	6 wk.	7 wk.
Control							
SO	94.4±3.1	95.2±1.3	95.6±1.2	97.3±0.9	96.3±2.0	94.8±1.8	98.2±0.7
FOG	5.6±3.1	4.8±1.3	4.4±1.2	2.7±0.9	3.7±2.0	5.2±1.8	1.8±0.7
Suspension							
SO	94.6±0.5	93.6±2.7	85.0±4.4*	89.7±2.7*	68.5±8.8*	80.4±6.4*	73.6±8.0*
FOG	5.4±0.5	6.4±2.7	15.0±4.4*	10.3±2.7*	31.5±8.8*	19.6±6.4*	26.4±8.0*

Values are mean±SD (N=3). *p<0.05 compared with control.

を示している。

以上の結果で観察されたように、本実験の宙づりモデルでは、ヒラメ筋の筋萎縮、筋線維組成の変化ともに尾部宙づり3週目以降に顕著であった。

3. ミオシン重鎖 (myosin Heavy Chain: HC)

ミオシン重鎖については、SDS-PAGE 後イムノブロット法により抗ミオシン速筋型重鎖抗体を用いて速筋型のミオシン重鎖アイソフォームを検出することにより分析を行った。なお、本抗体の反応性については、5—8%の濃度勾配のついた分離ゲルを用いた SDS-PAGE により確認した (Fig. 3)。ヒラメ筋と腓腹筋のミオシン重鎖を分析した結果、ヒラメ筋では2本のバンド (HCl, IIa, Fig. 3B) が、腓腹筋では3本のバンド (HCl, IIa, IIb, Fig. 3C) がそれぞれ認められた。これらのミオシン重鎖アイソフォームに対する抗ミオシン重鎖抗体の反応性を検討したところ、速筋型アイソフォームのみを認識することが確認された (Fig. 3E, F)。コ

ントロール群と宙づり群の全てのラットヒラメ筋についてこの抗体を用いて分析し、各週ごとの速筋型ミオシン重鎖の泳動パターンを Fig. 4 に示した。コントロール群 (Fig. 4B) では実験初期の段階で数匹のラットのみにわずかに速筋型ミオシン重鎖が認められたにすぎなかった。これに対し、宙づり群 (Fig. 4A) では宙づり3週目を境に全てのラットにおいて速筋型ミオシン重鎖の顕著な増加が認められた。

IV. 考 察

骨格筋の不使用・不活動に対する影響は、形態的には筋の萎縮が、機能的には遅筋の速筋化が挙げられ、その影響は速筋よりもヒラメ筋のような遅筋に顕著である。このような変化は、ラットの尾部宙づり実験のみならず、宇宙飛行実験においても同様な変化が認められること¹⁷⁾から、重力の除去あるいは軽減により生じたものと考えられる。したがって、抗重力筋のヒラメ筋に顕著な変化が認められることは妥当な結

Fig. 3. Immunoreactivity of various types of heavy chains for anti-fast myosin monoclonal antibody to rat skeletal muscle. IIa, Heavy chain IIa; IIb, Heavy chain IIb; I, Heavy chain I; A-D, Amido black staining; D-F, Immunostaining; A and E, soleus+gastrocnemius; B and F, soleus; C, gastrocnemius; D, 200 K molecular weight marker; The antibody reacts with only the fast type of myosin heavy chains IIa and IIb. SDS-PAGE was performed using 5—8% gradient running gel.

Fig. 4. Immunoblotting of myosin heavy chain with the anti-fast myosin heavy chain monoclonal antibody. Lane A, suspended soleus; lane B, control soleus; m, 200 K molecular weight marker; 1-7, each represent 1-7-week suspension periods.

果といえる。このヒラメ筋について、7週間のラット尾部宙づりに対する影響を、組織レベルと蛋白レベルから分析、検討した。

形態的な筋の萎縮に関して、本研究で用いたヒラメ筋重量は、宙づり3週目より著しい低下がみられ、その範囲はコントロール群と比較して45.5-68.0%の低下であった。これを筋を構成する筋線維のタイプ別に検討した場合、FOG線維に比べSO線維の萎縮率が高い傾向にあったが、両線維タイプの萎縮過程は筋重量低下の経時的変化と類似しており、両線維の萎縮が筋重量の低下を引き起こす要因になったものと推察される。筋萎縮の経時的変化を検討すると、宙づり2週目までは筋重量、筋線維横断面積ともに個体間のばらつきが大きくコントロール群と宙づり群では有意な差はみられず、3週目以降に著しい筋の萎縮を示した。実験期間中のある時期を境に筋に顕著な変化が認められたことの説明のひとつとして、筋に慢性的電気刺激を加え、そのミオシン軽鎖の変化を検討した Seedorf et al.²⁶⁾の報告が挙げられる。彼らは、160日間の連続電気刺激の結果、刺激60日から

90日の間にミオシン軽鎖の著しい変化がみられたことから、筋はある一定量以上の刺激を负荷してはじめて変化が生じると主張し、筋には変化が生じるための負荷刺激の量的閾値が存在するのではないかと推察している。この考えを適用するならば、本結果より宙づり3週目以降に顕著な変化がみられたことは、この期間に筋が変化するための閾値に達したのかもしれない。このような筋線維の萎縮は、宙づりによる筋への機械的負荷の除去、あるいは筋の活動レベルの低下が、蛋白合成速度の抑制、分解速度の促進をもたらしたものと推察されている^{14,33)}。

宙づりによるヒラメ筋の機能的側面への影響については、収縮時間の短縮^{28,30)}、酸化系酵素活性の低下¹¹⁾と解糖系酵素活性の増加¹³⁾、および速筋線維占有率の増加^{6,8,9)}、速筋タイプのミオシン分子の増加^{10,12)}などが報告されている。これらの報告は、宙づりによるヒラメ筋の速変化を示唆するものである。本研究では、ヒラメ筋の筋線維組成を分析した結果、コントロール群では実験期間を通して FOG 線維の占有率はほ

ば一定で、1.8—5.6%の低値を示した。これに対し、宙づり群では、宙づり3週目よりFOG線維占有率の増加が認められた。この結果は、これまでの報告と同様にヒラメ筋の速筋化を示している。このようなFOG線維占有率の増加についてはいくつかのメカニズムが考えられる。すなわち、(1) SO線維からFOG線維への筋線維のタイプ移行、(2) SO線維の選択的な消失による相対的なFOG線維の増加、(3) FOG線維の新生である。(1)のタイプ移行について論じる際には、筋線維の総数が実験の前後で変化していない。または実験群とコントロール群で差が認められないことが必要条件となる。この点に関し、Templeton et al.³¹⁾は、4週間の宙づり後にType IIa線維の増加がみられたラットヒラメ筋を用いて、硝酸消化法により直接筋線維総数を求めたところ、コントロール群と宙づり群で差がないことを報告している。さらに蛋白レベルにおいて胎児期、新生児期のミオシン分子が認められないことから(3)の筋線維の新生の可能性を否定し、(1)のタイプ移行の可能性を主張している。Corley et al.⁶⁾も、4週間の宙づり後、ヒラメ筋の組織標本から筋線維総数を算出し、コントロール群と宙づり群に差がないことから同様な可能性を示唆している。(2) SO線維の選択的消失については、ラットの下肢固定実験ではその可能性を示唆した報告⁴⁾がみられるが、本研究で行った宙づりモデルでは、SO線維の選択的消失の可能性はほとんどないと考えられる。それは、本研究においても先行研究にみられるようにSO線維がFOG線維に比べて萎縮率では高い傾向にあったものの、実際の横断面積は両線維で差がないこと、さらに実験期間を通して両線維の萎縮過程は類似しており、SO線維のみが選択的に萎縮し消失したとは考えにくいなどの理由による。以上のことから、本研究において、宙づりヒラメ筋にみられるFOG線維占有率の増加は、タイプ移行の可能性が最も高いと考えられる。しかしながら、これは組織化学的分析を基にした推察であり、他のメカニズムの可能性を完全に否定すること

はできない。従ってより詳細な検討を行うためにはさらにミクロな分子生物学的分析が必要とされる。このような観点から、本研究では、SDS-PAGEおよび抗ミオシン重鎖抗体を用いて、筋線維の収縮特性を規定し筋線維タイプを決定しているミオシン重鎖のアイソフォームについて分析を加えた。これにより、本研究で認められたFOG線維の増加が、SO線維からFOG線維へと移行したものであれば、分子レベルにおいて速筋型ミオシン重鎖の増加が予測される。分析の結果、コントロール群では速筋型ミオシン重鎖はほとんど確認されなかったのに対し、宙づり群では、宙づり3週目以降ほとんどのヒラメ筋で速筋型ミオシン重鎖の増加が認められた。この速筋型ミオシン重鎖の増加は、絶対量の増加によるものか、または相対的な割合が増加したものかは分からない。しかしながら、各筋線維の萎縮の状態からみた場合、両筋線維ともに50%前後の萎縮を示していることから、SO線維の収縮蛋白(遅筋型ミオシン)が選択的に分解され、速筋型ミオシン量が相対的に増加した可能性は低いと考えられる。したがって、本結果は速筋型ミオシン重鎖の絶対量が増加したものと推察される。この結果から、本研究で認められたFOG線維の増加は、SO線維からFOG線維へ移行した可能性が示唆され、宙づりによりSO線維は萎縮する一方で、その内部に速筋型ミオシン重鎖が合成されたことによりFOG線維へとタイプ移行したものと推察される。また、組織レベルと蛋白レベルから宙づりによるヒラメ筋の速筋化が示唆された。

組織レベルと蛋白レベルの経時的变化の関連性について検討したとき、速筋型ミオシン重鎖の増加とFOG線維の増加との間には時間的な遅延はみられず、同一時期に増加が認められた。このことは、SO線維からFOG線維への移行期の筋線維が、FOG線維として分類された可能性を示唆している。つまり、宙づり期間中、SO線維からFOG線維へとタイプ移行が完了する間には、ある一定の移行期間が必要と考えられる。この間、筋線維内には速筋タイプと遅筋タイプ

のミオシン重鎖が混在し、時間経過にともない速筋タイプの重鎖の割合が増し、遅筋タイプのミオシン重鎖が消失した時点でタイプ移行は完了する。したがって、速筋型のミオシン重鎖の増加時期と、SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行が完了する時期には時間的な遅延が生じると考えられる。逆に時間的な遅延が認められないならば、SO 線維から FOG 線維への移行期の筋線維も FOG 線維として類別された可能性が示唆される。このような移行期の筋線維に関して、Fitts et al.¹⁰⁾は、ラットに2週間の宙づりを施した結果、ヒラメ筋内に速筋型タイプのミオシン分子種と易動度が類似した中間型ミオシン分子の増加を報告している。Gardetto et al.¹²⁾は、2週間の宙づりにより最大短縮速度が29%増加したヒラメ筋で、単一筋線維内に遅筋型タイプと速筋型タイプ両方の分子種を含む混在型線維の増加を認め、これが短縮速度の増加に起因すると述べている。また、Templeton et al.³¹⁾も同様な結果を得ており、そのような混在型線維の割合が組織化学的に同定された Type IIa 線維の割合と近似であることから、混在型線維は組織化学的には Type IIa 線維として類別されたものと推察している。本結果は、速筋型ミオシン重鎖の増加と FOG 線維の増加の間に時間的な遅延は認められないことから、組織レベルで増加が認められた FOG 線維には、移行期の混在型線維も含まれる可能性があると考えられる。

本研究で用いた抗体は速筋型ミオシン重鎖の検出には有効であるが、反面そのサブタイプまでは検討できない。これまでの HC-IIa, HC-IIb に加え、近年、ラットを用いた電気刺激実験^{1,25,32)}や宙づり実験²⁹⁾により認められる新しい速筋型アイソフォーム (HC-IIc, または HC-2X) の分析についても今後の検討課題と考えられる。

V. 総 括

本研究は、ラット尾部宙づりによるヒラメ筋の筋線維組成および速筋型ミオシン重鎖分子種

の変化を検討することを目的とした。実験にはウイスター系雄性ラット 42 匹を用い、21 匹ずつをコントロール群と宙づり群に分け、宙づりは尾部宙づりにより行った。7 週間の実験期間中、各週毎により 3 匹ずつを分析に供した。組織化学的分析には左脚ヒラメ筋を、ミオシン重鎖分析には右脚ヒラメ筋を用いた。筋重量は、宙づり 3 週目より顕著な低下が認められた。筋線維横断面積も宙づり 3 週目より SO 線維、FOG 線維ともに顕著な萎縮が認められ、その萎縮は筋重量の低下と類似していることから、両筋線維の萎縮が筋重量の低下に大きく起因すると考えられる。筋線維組成に関して、コントロール群のヒラメ筋 FOG 線維占有率は実験期間を通して数%であったのに対し、宙づり群では、宙づり 3 週目以降のヒラメ筋において FOG 線維占有率の増加が認められた。この結果と対応して、宙づり 3 週目より速筋型ミオシン重鎖の増加が認められた。これらのことから、宙づりによる FOG 線維の増加は、SO 線維からのタイプ移行による可能性が示唆された。また、このような FOG 線維の増加は、速筋型ミオシン重鎖の増加を反映しており、組織レベルと蛋白レベルから宙づりによるラットヒラメ筋の速筋化が推察された。

謝辞：本稿の作成にあたり、貴重な御助言をいただきました熊本大学医学部薬理学教室山本秀幸講師に深謝いたします。

文献 (References)

- 1) Bär, A. and Pette, D. (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 235: 153-155.
- 2) Bárány, M. (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 50: 197-218.
- 3) Billeter, R., Weber, H., Lutz, H., Howald, H., Eppenberger, H.M., and Jenny, E. (1980) Myosin types in human skeletal muscle fibers. *Histochemistry* 65: 349-259.
- 4) Booth, F.W. and Kelso, J.R. (1973) Effect of hind-limb immobilization on contractile and his-

- tochemical properties of skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 342 : 231-238.
- 5) Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
 - 6) Corley, K., Kowalchuk, N., and McComas, A.J. (1984) Contrasting effects of suspension on hindlimb muscles in the hamster. *Exp. Neurol.* 85 : 30-40.
 - 7) Danieli-Betto, D., Zerabato, E., and Betto, R. (1986) Type 1, 2A, 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138 : 981-987.
 - 8) Desplanches, D., Mayet, M.H., Sempore, B., and Flandrois, R. (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 63 : 558-563.
 - 9) Elder, G.C.B. and McComas, A.J. (1987) Development of rat muscle during short- and long-term hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 62 : 1917-1923.
 - 10) Fitts, R.H., Metzger, J.M., Riley, D.A., and Unsworth, D.R. (1986) Models of disuse: A comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 60 : 1946-1953.
 - 11) Flynn, D.D. and Max, S.R. (1985) Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on rat skeletal muscle. *Aviat. Space Environ. Med.* 56 : 1065-1069.
 - 12) Gardetto, P.R., Schulter, J.M., and Fitts, R.H. (1989) Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspensin. *J. Appl. Physiol.* 66 : 2739-2749.
 - 13) Hauschka, E.O., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1987) Size and metabolic properties of single muscle fibers in rat soleus after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 62 : 2338-2347.
 - 14) Jaspers, S.R. and Tischler, M.E. (1984) Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J. Appl. Physiol.* 57 : 1472-1479.
 - 15) Kasper, C.E., White, T.P., and Maxwell, L.C. (1990) Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J. Appl. Physiol.* 68 : 533-539.
 - 16) Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during in the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227 : 680-685.
 - 17) Martin, T.P., Edgerton, V.R., and Grindeland, R. E. (1988) Influence of space flight on rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 65 : 2318-2325.
 - 18) Morey, E.R. (1979) Spaceflight and bone turnover: Correlation with a new rat model of weightlessness. *Bioscience* 29 : 168-172.
 - 19) Nachlas, M.M., Walker, D.G., and Seligman, M. (1958) A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 4 : 29-43.
 - 20) Padykula, H.A. and Herman, E. (1955) The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 3 : 170-195.
 - 21) Perrie, W.T. and Bumford, S.J. (1986) Electrophoretic separation of myosin isoenzymes. Implications for the histochemical demonstration of fibre types in biopsy specimens of human skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.* 73 : 89-96.
 - 22) Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A., and Stempel, K.E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11 : 2627-2633.
 - 23) Reiser, P.J., Moss, R.L., Giulian, G.G., and 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.
 - 24) Roy, R.R., Bello, M.A., Bouissou, P., and Edgerton, V.R. (1987) Size and metabolic properties of fibers in rat fast-twitch muscles after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 62 : 2348-2357.
 - 25) 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 fibres. *Acta Physiol. Scand.* 134 : 575-576.
 - 26) Seedorf, K., Seedorf, U., and 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.
 - 27) Sivaramakrishnan, M. and Burke, M. (1982) The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 257 : 1102-1105.
 - 28) Stevens, L., Mounier, Y., Holy, X., and Falempin, M. (1990) Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 68 : 334-340.
 - 29) Takahashi, H., Wada, M., and Katsuta, S. (1991) Expressions of myosin heavy chain IId isoform in

- rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol. Scand.* 143 : 131-132.
- 30) Templeton, G.H., Padalino, M., Manton, J., Glasberg, M., Silver, C.J., Silver, P., Demartino, G., Leconey, T., Klug, G., Hagler, H., and Sutko, J.L. (1984) Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 56 : 278-286.
- 31) Templeton, G.H., Sweeney, H.L., Timson, B.F., Padalino, M., and Dudenhoefter, G.A. (1988) Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 65 : 1191-1195.
- 32) Termin, A., Staron, R.S., and Pette, D. (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92 : 453-457.
- 33) Thomason, D.B., Herrick, R.E., Surdyka, D.D., and Baldwin, K.M. (1987) Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.* 63 : 130-137.
- 34) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76 : 4350-4354.

(平成4年3月9日受付)