萎縮ラットヒラメ筋のデスミン発現に及ぼす熱ストレス効果

杉 浦 崇 夫¹⁾ 芝 口 翼¹⁾ 吉 原 利 典¹⁾ 山 元 勇 樹¹⁾
後 藤 勝 正²⁾ 内 藤 久 士³⁾ 吉 岡 利 忠⁴⁾

EFFECT OF HEAT STRESS ON DESMIN EXPRESSION IN ATROPHIED SOLEUS MUSCLE

TAKAO SUGIURA, TSUBASA SHIBAGUCHI, TOSHINORI YOSHIHARA, YUKI YAMAMOTO,
KATSUMASA GOTO, HISASHI NAITO and TOSHITADA YOSHIOKA

Abstract

In the present study, we investigated the effect of heat stress on disuse atrophy from changes in the muscle protein levels of desmin and calpain. Wistar strain female rats (6-8 months old) were randomly assigned to two experimental groups: control (C) and heat stress (H). One hindlimb of all animals was immobilized in plantar flexion with plaster. Before immobilization, animals in H group were placed in a heat chamber (42°C for 60 min). Following 6 days of immobilization, the soleus muscles were removed and analyzed. Although immobilization resulted in significant muscle atrophy in all experimental animals, the soleus weight-to-body weight ratio in immobilized limbs of H group was significantly higher compared to that of C group. Expression of desmin and HSP72 in the atrophied soleus muscle from C group was significantly lower compared with the contralateral muscle; but this was not the case in H group. Further, in C group, the ratio of autolyzed calpains I increased significantly in the atrophied muscle compared to the contralateral muscle. These results show that the effect of heat stress on disuse skeletal muscle atrophy is attributed to the decreasing degradation of desmin by suppressing the activation of calpain.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 2010, 59: 167~174)

key word: desmin, calpain, atrophy, heat stress

I . 結 言

骨格筋は不活動によって萎縮する。これは、タンパク質分解と合成のバランスが崩れ、分解が合成を上回ることによって引き起こされる¹⁾。不活動によるタンパク質分解促進の要因として、酸化ストレスの増大や、それに伴う細胞内カルシウムイオンの増加などがあげられている^{2~4)}。細胞内に増加したカルシウムイオンは、カルシウム依存性のプロテアーゼであるカルパインを活性化する^{5,6)}。活性化したカルパインは、Z線に局在し隣接する筋原線維やサルコメアを結合しているデスミンなどの細胞骨格を

分解する^{5,7,8)}。デスミンノックアウトマウスでは、対照マウスと比較して筋損傷を起こしやすく、損傷後の再生過程において筋原線維の再生が不完全であることが報告されている⁹⁾。これらのことから、デスミンは筋原線維の構造を正常に維持するばかりか、筋再生においても構造上不可欠なタンパク質であると言える。

これまで、不活動によりカルパイン活性が亢進し¹⁰⁾、デスミン量は低下し、それらの間には負の相関が見られることが報告されている¹¹⁾。したがって、カルパインによるデスミンの分解を抑制することができれば、筋原線維の崩壊を防ぐことで、筋萎縮を

¹⁾ 山口大学教育学部スポーツ健康科学教室
〒753-8531 山口市大字吉田1677-1

²⁾ 豊橋創造大学リハビリテーション学部
〒440-8511 愛知県豊橋市牛川町松下20-1

³⁾ 順天堂大学スポーツ健康科学部運動生理学教室
〒270-1695 千葉県印旛郡印旛村平賀学園台1-1

⁴⁾ 弘前学院大学
〒036-8577 青森県弘前市稔町13-1

Department of Exercise and Health Sciences, Faculty of Education,
Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8513, Japan

Laboratory of Physiology, Toyohashi SOZO University, Toyohashi
440-8511

Department of Exercise Physiology, School of Health and Sports
Science, Juntendo University, Inba, Chiba 270-1695, Japan

Hirosaki Gakuin University, Hirosaki, Aomori 036-8577, Japan

軽減できると考えられる。

近年、熱ストレスを負荷することにより不活動や不動化による筋萎縮を抑制することが種々の萎縮モデル動物を用いて報告されている^{12,13)}。この機序の一つとして、熱ストレスによって誘導される熱ショックタンパク質(HSP)が持つ、損傷したタンパク質の凝集抑制、一部変性したタンパク質の修復機能、さらには抗酸化能力などの機能により、タンパク質分解が抑制されることによると考えられている¹⁴⁾。このように、熱ストレス負荷はタンパク質の分解抑制への関与が示唆されていることから、熱ストレス負荷によって誘導されるHSPが、先に述べたカルパインの活性化を抑制することによりデスミン量の低下を抑制し、筋原線維構造を安定化し、筋萎縮の軽減を可能にすることが考えられる。しかしながら、このような観点からの検討はこれまで行われていない。

そこで本研究は、熱ストレス負荷後、ラットに6日間のギプス固定を施し、筋萎縮に対する熱ストレスの負荷の影響について細胞骨格の一つであるデスミンを指標に検討することを目的とした。

Ⅱ．方 法

A．実験動物

本実験は、国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則に従い実施した。実験動物には、先行研究¹²⁾を参考に6～8ヶ月齢のWistar系雌ラット(n=13)を用いた。5日間の予備飼育後、対照群(C群, n=7, 361.9±14.2g)と熱ストレス群(H群, n=6, 370.2±12.7g)に体重が等しくなるように群分けした。H群には、庫内温度を42℃に設定した恒温器(ADVANTEC, IS-2400)に、無麻酔下で1時間放置し熱ストレスを負荷した。本研究においては、熱ストレス負荷中の直腸温の経時的変化については測定していないが、同様の方法で行った先行研究では熱ストレス負荷後、直腸温は経時的に上昇し、1時間後の直腸温は41.6±0.1℃であったことが報告されている。本研究では、熱ストレス負荷後サーミスタ(NIHON KOHDEN, MGA-Ⅲ)で測定した直腸温は40.5±0.1℃であった。熱ストレス負荷6時間後に、C群およびH群の左腓(それぞれCI脚およびHI脚)に、足関節が底屈位となるように、CASTFLEX-α(ALCARE, 15401)を用いてギプス固定を施した。

ラットの生育環境は、室温24±1℃、湿度50～60%とし、12時間の明暗サイクルを維持した。また、飼育期間中、ラットには飼料と水を自由に摂取させた。

6日間のギプス固定後、ラットをエーテル麻酔下で屠殺し、体重を測定した後、ヒラメ筋(SOL)を摘出した。摘出した筋は筋重量を測定し、分析するまで-80℃で凍結保存した。

B．サンプル処理

凍結した筋の筋腹から50～100mg程度筋を切り出し、切り出した筋の10倍量のIsolation Buffer[20mM Tris-HCl(pH 7.4), 25mM KCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1mM Dithiothreitol, 1%(v/v) Triton X-100, 1%(v/v) Phosphatase inhibitor cocktail(Nacalai Tesque, 07574-61), 1%(v/v) Protease inhibitor cocktail(Nacalai Tesque, 25955-11)]を加え、ホモジナイザー(ヤマト科学, OMNI TH)によって均質化し、遠心分離を行った(3000rpm, 4℃, 10分)。分離後、上清を回収した後、残った沈殿を用いSolaro¹⁵⁾の方法により筋原線維タンパク質を抽出した。

抽出後、可溶性タンパク質濃度はProtein Assay Kit(Bio-Rad, 500-0006)により、また筋原線維タンパク質濃度はBiuret法により測定した。その後、タンパク質濃度が2mg/mlになるようにSodium-dodecylsulfate(SDS) sample buffer[62.5mM Tris-HCl(pH 6.8), 2.3%(w/v) SDS, 30%(v/v) Glycerol, 0.05%(w/v) Bromophenol-blue, 5%(v/v) 2-Mercaptoethanol]を用いてサンプルの調整をそれぞれ行った。その後、Cool Block Bath(井内, EC-40)を用いて60℃で10分間加熱した。調整したサンプルは、分析を行うまで凍結保存した。

尚、デスミンの分析には筋原線維タンパク質を用い、その他の分析は可溶性タンパク分画を用い行った。

C．ウエスタンブロッティング

タンパク質は、SDS-PAGE法[7.5%(w/v) Acrylamide]により分離した。サンプルは、各レーン当たり10～20μgを負荷した。なお、泳動されたタンパク質量が同程度であったかを確認するためにアクチン発現量を指標に検討し、群間に差がないことを確認した(結果未掲載)。

電気泳動後、ミニトランスブロットセル (Bio-Rad, 170-3930) を用い、100 V で 1 時間通電を行い、Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜, Amersham Biosciences, RPN303F) にタンパク質を転写した。その後、5% (w/v) skim milk/TTBS [40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20] を用いて 1 時間のブロッキング処理を行った。

ブロッキング処理後、8℃に設定したインキュベーター内で一晩、一次抗体反応を行った。一次抗体には、以下のものを使用した。Desmin は、5% (w/v) Albumin/TTBS で 1:500 に希釈した anti-Desmin (Novocastra, NCL-DES-DER II), Actin は 5% (w/v) Albumin/TTBS で 1:5000 に希釈した anti-Actin (Sigma, A3853), Calpain I は、Can Get Signal Solution I (TOYOBO, NKB-101) で 1:1000 に希釈した anti-Calpain I (Cell Signaling, 2556), Calpain II は Can Get Signal Solution I で 1:1000 に希釈した anti-Calpain II (Sigma, C6111) であった。また、HSP72 抗体 (StressGen, SPA-812) は TTBS で 1:10000 に希釈したものを用了。

一次抗体反応終了後、PVDF 膜を TTBS で 10 分 × 3 セット洗浄し、室温で 2 時間、二次抗体反応を行った。二次抗体には、以下のものを使用した。Desmin は 5% Skim milk/TTBS で 1:20000 に希釈した Anti-Mouse IgG (SIGMA, A4416), Calpain I および Calpain II は、Can Get Signal Solution で 1:20000 に希釈した Anti-Rabbit IgG (SIGMA, A6154) であった。また、HSP72 の二次抗体には、TTBS で 1:20000 に希釈した Anti-Rabbit IgG ALP (SIGMA, A3687) を用いた。

二次抗体反応終了後、PVDF 膜を TTBS で 10 分 × 3 セット洗浄し、Desmin, Calpain I および Calpain II の検出は ECL Plus (GE Healthcare, RPN2132) を用い目的とするバンドを発光し行った。また、HSP72 の検出は Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, 170-6432) を用いて行った。

D. 解析

発光を行った PVDF 膜は冷却 CCD カメラ (ATTO, Light Capture AE-6961) で、Alkaline Phosphatase 染色を行った PVDF 膜はスキャナーでそれぞれコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (ATTO, CS Analyzer ver. 2.0) を用いて分析を行い、Desmin お

よび HSP72 については、C 群の対象脚 (CC) を基準とし各タンパク質の発現率を比較・検討した。また、Calpain I と II については、分子量 80 kDa の total Calpain とその分解型である分子量 75 kDa の自己分解型 (Autolyze) の Calpain 比ならびにそれらの積算値の合計により、上記と同様に CC の値を基準とし発現率を検討した。

E. 統計

得られたデータは、全て平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的分析は、一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた場合、Tukey 法により群間比較を行った。有意水準は全て危険率 5% 未満とした。

Ⅲ. 結 果

A. 筋重量・相対筋重量

表 1 に、筋重量と相対筋重量の結果について示した。固定脚の筋重量は C 群ならびに H 群ともに低値を示した ($p < 0.05$)。また、相対筋重量においても筋重量と同様の結果が得られたのに加え、HI 脚の相対筋重量は CI 脚よりも有意に高い値であった ($p < 0.05$)。

B. Desmin

CI 脚の Desmin 発現率は、CC 脚ならびに HC 脚と比較して有意に低い値であった ($p < 0.05$)。しかしながら、H 群では C 脚と I 脚の Desmin 発現率はほぼ同じレベルであった (図 1)。

C. Calpain I

図 2 (A) に Calpain I 発現率、(B) に 80 kDa Calpain I と Autolyze Calpain I の発現比についてそれぞれ示した。Calpain I 発現率は、C 群では I 脚の値は C 脚の値よりも高い値を示す傾向 ($p = 0.14$) にあったが、有意な差ではなかった。また、H 群では C 脚と I 脚の Calpain I 発現率は、ほぼ同じレベルであった。しかしながら、Autolyze Calpain I 比では CI 脚の値は CC 脚ならびに HC 脚よりも有意 ($p < 0.05$) に高かった。H 群の Autolyze Calpain I 比は C 脚と I 脚で有意差は認められなかった。

D. Calpain II

図 3 (A) に Calpain II 発現率、(B) に 80 kDa Cal-

Table 1. Effects of heat stress on soleus muscle masses and muscle weigh-to-body weight ratios

	CC (n=7)	CI (n=7)	HC (n=6)	HI (n=6)
Muscle weight (mg)	136.1±9.0	108.1±7.8*	171.2±3.7*,†	129.9±6.1 [§]
Soleus weight-to-body weight ratio (mg/kg)	397.3±15.8	314.6±13.7*	487.9±14.9*,†	369.6±16.2†,§

Definition of abbreviations: CC = contralateral soleus muscles in control group; CI = immobilized soleus muscles in control group; HC = contralateral soleus muscles in heat group; HI = immobilized soleus muscles in heat group. Values are means $\pm$ SE. n, no. of rats per group. *Statistically different from CC, $P < 0.05$. †Statistically different from CI, $P < 0.05$. [§]Statistically different from HC, $P < 0.05$.

Figure 1. Effects of heat stress on soleus muscle protein levels of desmin in atrophied soleus muscle induced by immobilization of the hind limbs of rats. Values are means $\pm$ SE; n=6-7 animals in each group. *Statistically different ($P < 0.05$) from CC.

pain II と Autolyze Calpain II の発現比についてそれぞれ示した。Calpain II 発現率は、いずれの場合においても有意差は認められなかった。同様に、80 kDa Calpain II と Autolyze Calpain II の発現比においても有意差は認められなかった。

E. HSP72

HSP72 発現率の結果を図 4 に示した。CI 脚の HSP72 発現率は、CC 脚ならびに HC 脚と比較して有意に低い値であった ($p < 0.05$)。しかしながら、H 群では C 脚と I 脚の HSP72 発現率はほぼ同じレベ

ルであった。

IV. 考 察

A. 概要

本研究は、これまで報告されている熱ストレスの筋萎縮抑制効果について、細胞骨格の一つであるデスミンを指標に検討した初めての研究である。得られた所見は、熱ストレス負荷が不活動によるカルパイン活性化の亢進を抑制することによりデスミン発現量の低下抑制をもたらし、その結果、筋萎縮を抑制することを示唆するものであった。以下に、本研

Figure 2. Effects of heat stress on soleus muscle protein levels of calpain I (A) and the ratio of autolyzed and unautolyzed calpains I (B) in atrophied soleus muscle induced by immobilization of the hind limbs of rats. Values are means $\pm$ SE; $n=6-7$ animals in each group. *Statistically different ($P<0.05$) from CI.

Figure 3. Effects of heat stress on soleus muscle protein levels of calpain II (A) and the ratio of autolyzed and unautolyzed calpains II (B) in atrophied soleus muscle induced by immobilization of the hind limbs of rats. Values are means $\pm$ SE; $n=6-7$ animals in each group.

Figure 4. Effects of heat stress on soleus muscle protein levels of HSP72 in atrophied soleus muscle induced by immobilization of the hind limbs of rats. Values are means $\pm$ SE; $n=6-7$ animals in each group. *Statistically different ($P<0.05$) from CI.

究の詳細について述べる。

B. ギブス固定が筋重量, カルパイン活性, およびデスミン動態に及ぼす影響

カルパインには, 細胞内カルシウムイオン濃度が μM レベルで活性化するカルパイン I と mM レベルで活性化するカルパイン II があることが知られている^{5,6)}。通常, 筋における細胞内カルシウムイオン濃度は約 $0.1 \mu\text{M}$ 以下であり¹⁶⁾, カルパイン I が活性化するとされるカルシウムイオンレベルは $3 \sim 50 \mu\text{M}$, カルパイン II では $0.4 \sim 0.8 \text{mM}$ である⁵⁾。カルパインは通常, その活性化を容易にする為に自己分解する^{5,17)}。また, カルパインの自己分解型は, カルパイン I とカルパイン II のそれぞれに存在することも知られており, カルパインの自己分解が起きているときには, カルパインが活性化しているものと考えられている^{5,17)}。

本研究において, ギブス固定脚の筋重量は, コントロール脚と比較して低い値となった。また, カルパイン I と II の発現率はいずれの群間においても有意な変化は見られなかったが, カルパイン I では, その活性化の指標となる自己分解型発現比は, 対照群の固定脚で高い値を示した。これらのことから, 本研究における固定脚では, カルパイン I 活性化の亢進が起きていると考えられる。

更に, ギブス固定を施した脚のデスミン発現量は, 対照脚と比べ低値を示した。デスミンはカルパインの基質のひとつであり⁸⁾, 不活動によりカルパイン活性は亢進し, デスミン量が低下し, これらには負の相関が見られることが報告されている¹¹⁾。従って, 本研究で得られた固定脚のデスミン発現量の低下は, カルパイン I の活性化亢進により起こり, 筋重量の低下に関係していたと考えられる。Enns ら¹¹⁾ は, 尾部懸垂によるラット大腿四頭筋の萎縮過程におけるカルパインとデスミンの関係について, カルパイン I 活性は尾部懸垂12時間では既に亢進し, デスミン発現の低下は尾部懸垂24時間後に観察されることを報告している。これらのことを考慮すると, カルパイン I 活性の亢進とそれに伴うデスミン分解は, 不活動開始初期に起こると考えられる。

また, 前述したように, 本研究においてカルパイン II 発現量ならびに自己分解型比は, 固定の影響は認められなかった。本研究で得られた所見は, 萎縮

モデルの違いがあるものの, Enns ら¹¹⁾の報告を支持するものと考えられる。すなわち, 彼らは9日間の尾部懸垂過程においてもカルパイン II 活性は変化しないことを報告している。このことは, 上述した如く通常カルパイン I はカルシウム濃度が μM レベルで活性化するのに対し, カルパイン II は mM レベルで活性化することから^{5,6)}, カルパイン II の変化は長期間の固定により, 萎縮がさらに進んだ時点で見られるのかもしれないが明らかではない。

C. 熱ストレス負荷がカルパイン活性, およびデスミン動態に及ぼす影響

本研究において, HC の筋重量は CC より有意に増加していた。このことは, 熱ストレス負荷により筋タンパク質合成が促進し, 筋肥大がもたらされたことを示す。これまで, 熱ストレス負荷が筋タンパク質合成を促進し筋肥大を招来する機序として, 新生ポリペプチドの折り畳みに関与する HSP72 発現増加, mRNA の翻訳を促進させタンパク質合成をもたらす Akt/mTOR 系シグナル伝達物質のリン酸化亢進, さらに筋衛星細胞の活性化などが示されている¹⁸⁾。本研究では, Akt/mTOR 系シグナル伝達物質や筋衛星細胞について検討していないが, HC の HSP72 発現量は CC と比較し有意差は認められないものの高い値を示す傾向にあったことから ($p=0.084$), これらの機序により HC の筋重量が CC よりも高い値を示したものと考えられる。

不活動が引き起こす筋萎縮への対抗手段として, 近年, 熱ストレス負荷が注目されている。熱ストレスによって誘導される HSP72 は, 翻訳過程において新生ポリペプチドのシャペロンとして機能しタンパク質合成にかかわっているばかりではなく, 酸化ストレスなどにより一部立体構造が崩れたタンパク質が再び折りたたまれるのを補助しタンパク質の凝集を阻止するなどの役割を演じている。Naito ら¹²⁾ は, 尾部懸垂前に熱ストレスを負荷したラットヒラメ筋では, 尾部懸垂による筋萎縮が抑制されたことを報告し, 熱ストレス負荷による HSP72 の誘導は, 不活動時の筋タンパク質分解抑制および合成維持に効果があることを示唆している。また, Selsby ら¹³⁾ は, 熱ストレス負荷による HSP72 の誘導は, ギブス固定によって増大する酸化ストレスを軽減し, 筋萎縮を抑制することを報告している。

本研究において、熱ストレスを負荷した固定脚の相対筋重量は、熱ストレスを負荷していない固定脚よりも有意に高い値を示した。また、熱ストレスを負荷していない固定脚のHSP72発現量、およびデスミン発現量は、両条件でのコントロール脚よりも有意に低く、カルパインⅠ自己分解型発現率は有意に高かった。一方、熱ストレスを負荷した固定脚では、これらの値はコントロール脚と有意差が見られなかった。これらのことから、ギプス固定による筋萎縮に対して熱ストレスを負荷することは、固定によるHSP72発現の低下を抑制し、酸化ストレスによる膜タンパク質の変性を阻止することで細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制することによりカルパイン活性の亢進とその後起こるデスミンの分解を抑制し、その結果筋萎縮を抑制したと考えられる。さらには、HSP72が持つ変性したタンパク質の修復機能が関係していたのに加え¹⁴⁾、上述した熱ストレスによる筋タンパク質合成促進も関与していたかもしれない。

また、トレーニングした筋では伸張性収縮による筋損傷を起こしにくく、この機序としてトレーニングした筋ではZ線周辺に多く発現し筋原線維の微細構造を維持していると考えられているHSP25や α -Bクリスタリンといった低分子量HSPが多く発現していることが報告されていることから^{19,20)}、本研究においてもHSP72以外のHSPも、熱ストレスによる筋萎縮抑制機構に関係しているとも考えられる。

これまで、不活動によりHSP72発現量は低下するが、不活動前に熱ストレスを負荷することによりHSP72発現量の低下を抑制することが報告されている¹²⁾。本研究においても対照群では、固定脚のHSP72発現量は対照脚よりも有意に低かったのに対し、熱ストレス群では対照脚と固定脚の間には有意な差は認められなかった。不活動あるいは不動化により招来される筋萎縮中のHSP72の低下の原因については明らかではないが、HSP72発現量は筋活動量と密接な関係にある^{14,21)}ことから、不活動(不動化)による筋活動の低下の影響が酸化ストレスによるHSP72発現量の増加よりも優位だったことによると推察される。また、熱ストレスを負荷することにより、このようなHSP72発現量の低下を抑制したのと考えられる。

V. 結 語

本研究は、熱ストレス負荷(42℃, 60分)の筋萎縮抑制効果について、6～8ヶ月齢のWistar系雌ラットのヒラメ筋を被検筋に、細胞骨格の一つであるデスミンを指標に検討した。

その結果、熱ストレス負荷による筋萎縮抑制の要因の一つとして、熱ストレス負荷が不動化によるHSP72発現量の低下を抑制することによりカルパインの活性化を抑制し、その結果、デスミン分解が抑制されたことによりもたらされたと考えられた。

謝 辞

本研究の実施に際し、多大な協力を頂いた本研究室海老原薫さんに深謝する。また、本研究の一部は、平成20年度科学研究費補助金基盤研究(C)(杉浦, 課題番号, 20500578), 平成18年度科学研究費補助金基盤研究(A)(古岡, 課題番号 18200042)ならびに平成21年度山口大学教育学部研究支援経費によって実施された。

(受理日 平成21年12月22日)

文 献

- 1) Thomason D.B., Booth F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol.* (1990) **68**, 1-12.
- 2) Kondo H., Kodama J., Kishibe T., Itokawa Y. Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett.* (1993) **326**, 189-191.
- 3) Ingalls C.P., Wenke J.C., Armstrong R.B. Time course changes in $[Ca^{2+}]_i$, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Environ Med.* (2001) **72**, 471-476.
- 4) Powers S.K., Kavazis A.N., McClung J.M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol.* (2007) **102**, 2389-2397.
- 5) Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The Calpain System. *Physiol Rev.* (2003) **83**, 731-801.
- 6) 小野弥子・反町洋之・鈴木紘一. タンパク質分解—分子機構と細胞機能—, 第1版, カルパイン-カルバスタチン系, シュブリンガー・フェアラーク東京株式会社, 東京, (2000), 59-70.
- 7) Wang K., Ramirez-Mitchell R. A network of transverse and longitudinal intermediate filaments is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle. *J Cell Biol.* (1983) **96**, 562-570.
- 8) 野坂和則. 運動分子生物学, 第1版, 細胞骨格, ナッブ, 東京, (2000), 43-62.
- 9) Li Z., Mericskay M., Agbulut O., Butler-Browne G., Carlsson L., Thornell L.E., Babinet C., Paulin D. Desmin

- is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol.* (1997) **139**, 129-144.
- 10) Wagatsuma K. Effect of hindlimb immobilization on μ -calpain and m-calpain activities. *鹿屋体育大学学術研究紀要* (2007), **36**, 17-23.
 - 11) Enns D.L., Raastad T., Ugelstad I., Belcastro A.N. Calpain/calpastatin activities and substrate depletion patterns during hindlimb unweighting and reweighting in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* (2007), **100**, 445-455.
 - 12) Naito H., Powers S.K., Demirel H.A., Sugiura T., Dodd S.L., Aoki J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol.* (2000) **88**, 359-363.
 - 13) Selsby J.T., Dodd S.L. Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2005) **289**, 134-139.
 - 14) 内藤久士・小林裕幸. 運動とタンパク質 遺伝子, 第1版, 骨格筋におけるストレスタンパク質の発現とその役割, ナップ, 東京, (2004), 167-180.
 - 15) Solaro R.J., Pang D.C., Briggs F.N. The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta.* (1971) **245**, 259-262.
 - 16) 後藤勝正. 運動分子生物学, 第1版, 運動と横行小管—筋小胞体, ナップ, 東京, (2000), 89-104.
 - 17) Vermaelen M., Sirvent P., Raynaud F., Astier C., Mercier J., Lacampagne A., Cazorla O. Differential localization of autolyzed calpains 1 and 2 in slow and fast skeletal muscles in the early phase of atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2007) **292**, 1723-1731.
 - 18) 杉浦崇夫, 後藤勝正, 内藤久士. 筋損傷からの回復を促す温熱刺激, *体育の科学*. (2006), **56**, 714-719.
 - 19) Koh T.J. Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury?. *Exerc Sports Sci Rev.* (2002) **30**, 117-121.
 - 20) Koh T.J., Escobedo J. Cytoskeletal disruption and small heat shock protein translocation immediately after lengthening contractions. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2004) **286**, 713-722.
 - 21) 轟木一弘, 杉浦崇夫, 後藤勝正, 内藤久士, 吉岡利忠. 異なる速度での一過性の走運動とトレーニングに伴うラット骨格筋の熱ショックタンパク質発現量の変化, *体力科学*. (2004), **53**, 537-547.