

## 尾部懸垂によるラットヒラメ筋におけるミオシンアイソフォームの分布の変化

奥本 正\* 斉藤 綾子\*\* 勝田 茂\*\*\*  
 新畑 茂充\*\*\*\* 菊地 邦雄\*\*\*\* 和田 正信\*\*\*\*

## EFFECTS OF HINDLIMB SUSPENSION ON PATTERNS OF MYOSIN ISOFORMS IN RAT SOLEUS MUSCLE

TADASHI OKUMOTO, AYAKO SAITOH, SHIGERU KATSUTA, SHIGEMITSU NIIHATA,  
 KUNIO KIKUCHI and MASANOBU WADA

## Abstract

Using several electrophoretic techniques, this study examined the effects of 3 weeks hindlimb suspension on the patterns of isomyosins, myosin heavy chain (HC) isoforms and myosin light chain (LC) isoforms in the soleus muscle of the rat. The suspended soleus showed a shift in the HC isoform distribution with a marked increase in fast HC isoforms and a commensurate decrease in HCl. In addition, the change in the fast HC isoforms consisted of the expression of HClId and HC IIb absent in the normal soleus. In contrast to HC isoforms, suspension did not lead to appreciable changes in LC isoform distribution. Analyses of electrophoresis under non-denaturing conditions demonstrated that the normal soleus expressing HCl and HCIIa isoforms contained two isomyosins. Although, of the two isomyosins observed in the normal soleus, the faster migrating band most likely represented the HCIIa-based one (FMas), its mobility was not identical with that of the HCIIa-based isomyosin (FMaf) found in fast-twitch muscles, migrating in the order FMaf > FMas. FMas was designated as intermediate isomyosin (IM). Some of the suspended soleus contained slow isomyosin (SM) and IM whereas the others comprised FM3 and/or FM2 as well as SM and IM. In spite of the expression of HCIIb and HClId in the suspended soleus, FM3 and FM2 observed in these muscles exhibited distinct mobilities from either HClId-based or HCIIb-based isomyosins comprised in fast-twitch muscles. These results suggest that some of newly expressed HClId and/or HCIIb isoforms in the suspended soleus are associated with not only fast but also slow LC isoforms and function as a constitutive element of the myosin molecule.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 1997, 46: 279~288)

**key words**: hindlimb suspension, isomyosins, myosin heavy chain isoforms, myosin light chain isoforms.

## I. 緒 言

ミオシンは骨格筋タンパクの約45%を占め、分子量約20万の重鎖 (heavy chain, HC) 2分子と、分子量約2万前後の軽鎖 (light chain, LC) 4分子からなっている。HC, LC には細胞内での働きは

同じであるが、構造が異なるアイソフォームが数種類存在している。これまでラットにおいて、3種類の fast type HC (HCIIa, HCIIb, HClId), 3種類の fast type LC (LC1f, LC2f, LC3f), 1種類の slow type HC (HCl), および3種類の slow type LC (LC1sa, LC1sb, LC2s) が、発現して

\*筑波大学大学院体育科学研究科  
 〒305 つくば市天王台1-1-1

\*\*茨城県立医療大学保健医療学部作業療法学科  
 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町阿見4669-2

\*\*\*筑波大学体育科学系  
 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

\*\*\*\*広島大学総合科学部  
 〒739 広島県東広島市鏡山1-7-1

*Doctoral Program in Health and Sport Sciences, University of Tsukuba. Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan*

*Department of Occupational Therapy, School of Health Sciences, Ibaraki Prefectural University of Health*

*Sciences. Ami-machi Inashiki-gun, Ibaraki, 300-03, Japan*

*Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba. Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan*

*Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University. Higashihiroshima, Hiroshima, 739, Japan*

いることが明らかにされている<sup>1)</sup>。これらの組み合わせにより様々なミオシン分子のアイソフォーム(アイソミオシン)が存在し、筋の収縮速度は分布するアイソミオシンの種類によって主に決定される<sup>2)</sup>。

ラット尾部懸垂モデルは後肢の体重支持を取り除くことによって、後肢の筋にかかる負荷を減少させるモデルである。これにより抗重力筋、特にヒラメ筋においてアイソミオシンの分布が変化し、それに付随して筋の収縮速度も変化する<sup>3,4)</sup>。HCの変化に関しては、懸垂2週間以上でHCIの相対的な割合が減少するとともに、これまで正常なヒラメ筋において発現していないHCIIaあるいはHCIIbが新たに発現することが示されている<sup>5,6)</sup>。一方、LCに関する報告は少なく、それらの研究のほとんどではLCの割合には変化が認められていない<sup>3,7)</sup>。したがって、懸垂によって新しく発現したHC(HCIIaあるいはHCIIb)はslowタイプのLCと結合していると考えられている。しかし、このようなミオシン分子の存在は全筋レベルにおけるHCおよびLCの各々の相対的な割合の変化から推察されたもので、実際にslow type LCとHCIIaあるいはHCIIbが結合し、ミオシン分子として機能しているかどうかは明らかではない。また、ミオシンHC、LCアイソフォームの発現に変化が生じるとき、HCとLCとが結合せず遊離型のHC、LCが存在している可能性も指摘されている<sup>8)</sup>。したがって、ミオシンの変化から筋の収縮特性の変化を類推しようとする場合、HC、LCのアイソフォームの相対的な割合の変化を観察するだけでなく、ミオシンをHCとLCとが結合した状態でも評価する必要があると思われる。

これらのことから、本研究ではHC、LCに加え、アイソミオシンの変化も観察することによって、尾部懸垂に起因して生じるミオシンフィラメントにおける変化を詳細に検討した。

## II. 方 法

### A. 実験動物および尾部懸垂の方法

実験には12~14週齢のWistar系雌雄ラット12

匹(220~377g)を用いた。これらをランダムに尾部懸垂群(n=7, ♂=2, ♀=5)、とコントロール群(n=5, ♂=2, ♀=3)に分類した。

懸垂はMorey-HoltonとWronski<sup>9)</sup>が開発した懸垂法を改良して行った<sup>10)</sup>。コントロール群、懸垂群ともに水、飼料(オリエンタル酵母工業社製、実験動物用固形飼料MF)を自由に摂取させた。温度22±2℃、湿度60±5%を常時維持し、照明は午前8時と午後8時を境とする明暗サイクルとした飼育室にてラットを飼育した。

3週間後、エーテルによるオーバードースによってラットを屠殺し、その後両足のヒラメ筋を摘出した。摘出した筋をあらかじめ液体窒素で冷却したイソペンタンの中で急速冷凍し、分析まで-80℃で保存した。

### B. 筋タンパクの抽出

ミオシンLCの分析のために、筋の筋腹部位約10~20mgを40倍の抽出液(5M urea, 2M thiourea, 0.017% (w/v) β-mercaptoethanol, 10mM sodium pyrophosphate)でホモジネートし、分析まで-80℃で保存した。残りのサンプルから筋原線維を抽出し、ミオシンHC、アイソミオシンの分析に用いた。筋原線維の抽出はCaiozzoら<sup>11)</sup>の方法を一部修正して行った。筋をパウダー状にした後、250mM sucrose, 100mM KCl, 20mM imidazole, 5mM EDTAを含む溶液(pH 6.8) 0.7ml中でホモジネートし、1000gで10分間(4℃)遠心分離を行った。沈殿物を0.5% (w/v) triton X-100を含む150mM KCl溶液(pH 6.8)中で再びホモジネートし、1000gで10分間(4℃)遠心分離を行った。この作業を2回繰り返す。その後、沈殿物を150mM KCl, 20mM imidazoleを含む溶液(pH 7.0)でホモジネートし、同様に遠心分離を行った。この作業も2回繰り返す。沈殿物を同じ溶液に懸濁させた。この溶液のタンパク濃度をLowryら<sup>12)</sup>の方法によって測定した。

### C. 電気泳動

#### 1. ミオシン重鎖

ミオシンHCアイソフォームの分離にはDoucet & Trifaro<sup>13)</sup>の方法を修正したドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動(sodium dodecyl

sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 法を用いた。濃縮ゲルの組成は3.43% (w/v) acrylamide, 0.07% (w/v) bis-acrylamide, 125 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl (Tris-HCl; pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) ammonium persulfate であった。分離ゲルの組成は7.5% (w/v) acrylamide, 0.2% (w/v) bis-acrylamide, 0.2 M Tris/0.1 M glycine (pH 8.6, 6 °C), 30% (v/v) glycerol, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.06% (w/v) ammonium persulfate であった。1 レーンあたり 1  $\mu$ g の筋原線維タンパクを負荷し, 200 V で36 時間泳動を行った。泳動終了後, Oakley<sup>14)</sup>の方法に従い銀染色を行った。定量にはデンストメーター (CS-9000, 島津) を用いた。

## 2. ミオシン軽鎖

ミオシン LC アイソフォームを一次元目に等電点電気泳動, 二次元目に SDS-PAGE を用いたミクロ二次元電気泳動によって分離した。一次元目のゲルは 4 % (w/v) acrylamide, 0.1% (w/v) bis-acrylamide を支持体とし, 0.6% (pH 3.5~10) および 1.6% (pH 5~8) ampholine を含んだゲルを用い<sup>15)</sup>, 幅 2 mm, 厚さ 1 mm, 長さ 50 mm の矩形状の中で泳動を行った (AE-6050 A 型, ATTO)。泳動は冷蔵庫内 (4 °C) で行い, 最初の20分は 100 V, その後の80分間は 300 V で通電した。一次元目の泳動終了後, 10% (w/v) trichloroacetic acid, 5 % (w/v) 5-sulfosalicylic acid dihydrate で固定した後, 二次元目の泳動を行った。二次元目の SDS-PAGE には 16% (w/v) acrylamide, 0.43% (w/v) bis-acrylamide, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.6, 22°C), 0.8% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.04% (w/v) ammonium persulfate を含む溶液を分離ゲルとして用いた。なお濃縮ゲルの組成は 3 % (w/v) acrylamide, 0.08% (w/v) bis-acrylamide の濃度を用いた以外は HC の分離で用いたものと同様であった。通電は濃縮ゲル中は 30 mA, 分離ゲル中は 50 mA であった。泳動終了後, coomassie blue-R 染色を行い, 脱色した。

LC の定量は Bar ら<sup>16)</sup>の方法に従って行った。それぞれの LC アイソフォームに相当するスポット

を切り出し, それを25%ピリジンを含む溶液で一晩中インキュベートした。これにより溶液中にタンパク質と結合した色素が溶出し, 溶液の吸光度を 605 nm の波長で分光光度計にて測定した。それぞれの LC の割合はブランク (LC のスポットと同じサイズで染色されていないゲルの部分) で補正した後, モル比で表わした。

## 3. アイソミオシン

アイソミオシンの分離にはスラブゲルシステム (Desaphor VA150, Desaga, Heiderlberg, Germany) を用い, Cavaille ら<sup>17)</sup>と Termin and Pette<sup>18)</sup>の方法を修正したピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (pyrophosphate polyacrylamide gel electrophoresis; PPI-PAGE) を行った。

ゲル溶液の組成は, 26.7 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (pH 8.5), 15 mM taurine, 8 % (v/v) glycerol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 % (w/v) acrylamide, 0.11% (w/v) bis-acrylamide, 0.25% (v/v) TEMED, 0.06% (w/v) ammonium persulfate であった。ランニングバッファの組成は 40 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (pH 8.5), 2 mM EGTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8 % (v/v) glycerol であった。120 V で30 分間予備泳動を行った後, 10  $\mu$ g の筋原線維タンパクを負荷し, ランニングバッファの温度を 0 ~ 3 °C に保ち, 120 V で約72時間泳動を行った。泳動終了後, Oakley<sup>14)</sup>の方法に従い銀染色を行った。染色されたゲルを写真にとり, それをスキャナー (GT-6500, EPSON) によってコンピューターに取り込み, NIH-Image (Ver. 1.58) によって定量化した。なお, アイソミオシンの同定は Termin と Pette<sup>18)</sup>の方法に従った。

## D. 統計処理

本研究では HC, LC, アイソミオシンの分布において, 明確な雌雄差が認められなかったので, 雌雄をまとめて一つの群として扱った。統計量は平均値±標準偏差で示した。両群の差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。なお有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## III. 実験結果

### A. ミオシン重鎖

図1にコントロール群, 懸垂群の典型的な泳動

パターンを示した。コントロール群のヒラメ筋では、HCI と HCIIa の 2 種類の HC が観察された。一方、懸垂群では HCI と HCIIa に加えて、分析した全てのラットにおいて HCIIId の発現が認められた。

両群の HC アイソフォームの構成比を表 1 に示した。懸垂群では、コントロール群より HCI が 16.3% 有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。コントロール群では HCIIId は 0% であったのに対し、懸垂群では  $13.5 \pm 4.9\%$  であった ( $p < 0.01$ )。HCIIa に関しては、コントロール群と懸垂群との間には有意な差は認められなかった。また、懸垂群の 4 匹 ( $\sigma$

$= 1$ ,  $\text{♀} = 3$ ) においては HCIIb も認められ、その範囲は 2.1~9.7% であった。

### B. ミオシン軽鎖

先行研究において、LC1s には LC1sa と LC1sb の 2 種類が存在することが示されているが、ラットでは LC1sa の割合は低く、本研究においてもほとんど認められなかった。LC1sa が認められた筋に関しては、LC1sa と LC1sb をまとめて LC1s として表記した。

両群の LC アイソフォームの構成比を表 2 に示した。両群ともに slow タイプの LC が含まれている割合が 90% 以上であった。両群の LC アイソフォームの割合には有意な差は認められなかった。

### C. アイソミオシン

典型的なアイソミオシンの泳動パターンを図 2 に示した。3 週齢のヒラメ筋において、2 本のバンドが認められた。(図 2; lane 1)。この筋で発現している HC は、HCI と HCIIa のみであり、他の速筋タイプの筋(図 2; lane 5, 6)のアイソミオシンの移動速度から考えると、これらは移動速度が速い順に fast isomyosin (FM) FM3a > slow isomyosin (SM) であると思われる。

Termin と Pette<sup>18)</sup> は、我々の用いた泳動システムと同じものを用い、アイソミオシンの移動速度を検討したところ、これまで intermediate

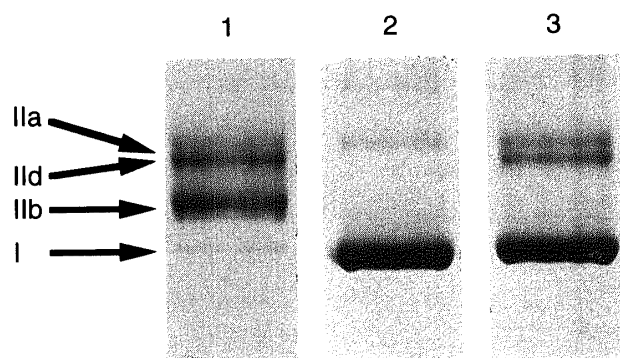


Fig. 1. Electrophoretically separated myosin heavy chain isoforms of marker (plantaris, lane 1), control (lane 2) and hindlimb suspended (lane 3) solues muscle. Abbreviations: I, slow heavy chain HCI; IIa IIId, IIb, fast heavy chain isoforms.

Table 1. Percentage distribution of myosin heavy chain (HC) isoforms in soleus muscle from control and hindlimb suspended (HS) rats.

Group	n	HC I	HC IIa	HC IIId	HC IIb
control	5	87.4 ± 8.2	12.6 ± 8.2	0	0
HS	7	71.1 ± 11.9*	12.5 ± 5.0	13.5 ± 4.9*	2.9 ± 3.6

Values are means ± SD. \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Table 2. Percentage distribution of myosin light chain (LC) isoforms in soleus muscle from control and hindlimb suspended (HS) rats.

Group	n	slow type LC		fast type LC		
		LC 1s	LC 2s	LC 1f	LC 2f	LC 3f
control	5	42.3 ± 3.3	51.8 ± 3.9	1.7 ± 1.9	3.0 ± 2.4	1.2 ± 1.8
HS	6	47.3 ± 4.8	49.2 ± 1.7	0.2 ± 0.5	3.3 ± 4.0	0

Values are means ± SD.

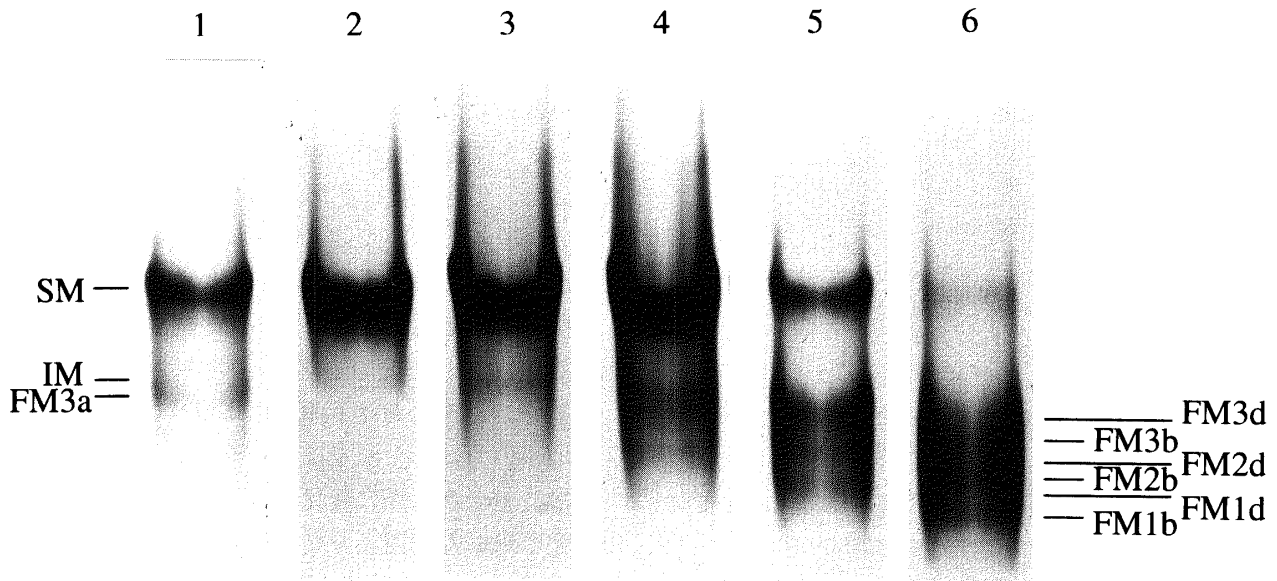


Fig. 2. Electrophoretically separated isomyosins of marker (lane 1, 21 d soleus; lane 5, diaphragm; lane 6 plantaris), control (lane 2) and hindlimb suspended (lane 3, 4) solues muscle. Abbreviations : SM, slow isomyosin ; IM, intermediate isomyosin; FM, fast isomyosin.

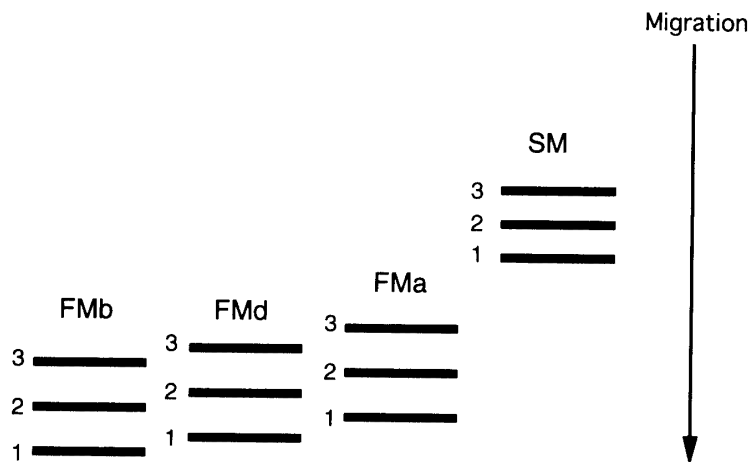


Fig. 3. Schematic illustration of electrophoretic mobilities of isomyosin triplets in adult rat skeletal muscle. Abbreviations : SM, HCl-based slow isomyosin ; FMa, HClIa-based fast isomyosin ; Fmd, HClId-based fast isomyosin ; Fmb, HClIb-based fast isomyosin.

myosin (IM) と同定されたミオシンは, FM 3 a と同じ移動速度を示すことを指摘している. しかし本研究においては SM と FM 3 a の間の移動速度を示すアイソミオシンが認められた. 本研究ではこの SM と FM 3 a の間の移動速度を示すアイソミオシンを IM を呼ぶことにした.

コントロール群においては SM と IM は認められたが, FM 3 a は認められなかった. 一方懸垂群では, SM と IM の 2 種類のアイソミオシンが認

められたものと (図 2; lane 3; n=4), SM と IM の他に FM 3 や FM 2 のアイソミオシンが認められたもの (図 2; lane 4; n=3) の 2 タイプの泳動パターンが認められた. FM が認められた筋における分離パターンは, コントロール群と比較すると, IM から FM の間が銀染色に対して濃染される傾向にあること, また IM や FM のバンドが鮮明でないことなどに特徴があった. これは様々な HC と LC の組み合わせによって, これまで考えられ

Table 3. Percentage distribution of isomyosin in soleus muscle from control and hindlimb suspended (HS) rats.

Group	n	SM	IM+FM
control	5	88.1± 8.2	11.9± 8.2
HS	7	75.2±12.8	24.8±12.8

Values are means±SD. SM, slow isomyosin ; IM, intermediate isomyosin ; FM, fast isomyosin.

てきた以上に多種におよぶアイソミオシンが存在していることと PPI-PAGE の分離能の限界に起因していると考えられる。したがって本研究では、アイソミオシンの分布の変化を SM と IM+FM の割合として数値化した。

表 3 には各群のアイソミオシンの分布を示した。懸垂群ではコントロール群より SM が 12.9% 低値を示す傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

#### IV. 考 察

速筋を支配する神経のものと類似した刺激パターン（高頻度，低回数）をヒラメ筋に与え，HC の変化を観察した先行研究では，HCIIa は発現するが HCIIb は発現しないことが認められている<sup>19,20</sup>。これらの知見から，筋線維は条件さえそろえばどのようなタイプにでも移行するのかというそうではなく，HC の発現に関して筋線維毎に固有の適応範囲が存在するとされてきた<sup>20</sup>。本研究において，7 匹中 4 匹ではあるが懸垂群において HCIIb が検出された事実は，これまで考えられてきたより高い可塑性をヒラメ筋の筋線維が有していることを示唆している。発現している HC のアイソフォームの種類が，筋線維の最大収縮速度を規定する因子の 1 つであることが広く認められており<sup>21,22</sup>，したがって，本研究で観察された fast type HC (HCIIa, HCIIc および HCIIb) の発現の亢進によって，ヒラメ筋の最大収縮速度は増加しているものと思われる。本研究と同様の期間（3 週間）尾部懸垂をラットに負荷し，ヒラメ筋の最大収縮速度が約 2.2 倍速くなったことを示した McDonald & Fitts の報告<sup>23</sup>は，これを裏付けるものである。

近年，筋の収縮速度は HC だけでなく LC のアイソフォームによっても影響を受けることが示されていることから<sup>22,24</sup>，本研究では LC の分布についても検討したが，いずれの LC アイソフォームについても変化は認められなかった。慢性的な電気刺激あるいは代償性肥大になどによって遅筋化が進行している筋では，HC は LC より早期に変化することが明らかになっている<sup>25,26</sup>。尾部懸垂が施されたヒラメ筋のように，速筋化が起こっている筋における HC および LC の経時的変化については明らかではないが，遅筋化の場合と同様に HC から先に変化が生じるのであれば，本研究で用いた期間よりさらに長期間懸垂を施すことにより，LC も変化が起こればと考えられる。そして，そのような LC の変化により，fast type HC と fast type LC が結合したアイソミオシンが増加すれば，ヒラメ筋の最大収縮速度は，McDonald & Fitts<sup>23</sup> が報告したものより，さらに高くなるものと推察される。

SDS-PAGE を用いたヒラメ筋の単一筋線維レベルでの分析から，Sugiura ら<sup>27</sup> は type I 線維に slow と fast の両タイプの LC を発現している筋線維が，また Staron & Pette は<sup>28</sup> type IIA 線維にも同様にそのようなものが存在していることを報告している。これらの報告と，本研究においてヒラメ筋に含まれる HCI と slow type LC (LC1s および LC2s) の割合が大きく異なることは (表 1 および 2)，HCIIa に slow type LC が結合しているような混在型のアイソミオシンの存在を示唆している。しかし SDS-PAGE では HC と LC は分離して別々に分画されるため，そのような混在型アイソミオシンが実際に存在しているかどうかは，これらの結果から明確に結論づけることはできない。

本研究では，この問題についてさらに詳細な検討を行うために，SDS-PAGE に加え PPI-PAGE による分析も行った。PPI-PAGE を用いた近年の研究において，ヒラメ筋に多く含まれるアイソミオシンは，SM と fast type アイソミオシンの中では泳動中の移動速度が最も遅い FM (FM3a) であり，SM は (LC1s)<sub>2</sub>(LC2s)<sub>2</sub>-HCI<sub>2</sub> から，また

FM3a は  $(LC1f)_2(LC2f)_2-HCIIa_2$  から構成されていると結論されている<sup>18)</sup>。これに対して本研究では、コントロール群では FM3a に相当する位置にバンドは観察されず、代わって SM と FM3a 間にバンド (IM) が認められた (図 2)。PPi-PAGE におけるアイソミオシンの移動速度は、含まれる LC と HC の両方の影響を受るため、IM は先に述べた混在型アイソミオシンである可能性が高い。先行研究<sup>18)</sup>とは異なり、本研究において FM3a が存在しなかった素因については明らかではないが、用いたラットの種あるいは飼育環境の違いなどが、その可能性として考えられる。

尾部懸垂によって、コントロール群には認められない移動速度の速いアイソミオシン (FM) が観察されるようになったが (図 2)、これらのアイソミオシンを構成するサブユニットという観点から、これは極めて興味深い知見である。移動速度の速いアイソミオシンを発現しているラットにおける fast type HC (HCIIa, HCIIId および HCIIb) の割合は約 40.0% であり、これは IM+FM の割合 (37.6%) とほぼ一致していた。また、fast type HC の中では HCIIa のみを含んでいる筋では、FM は存在せず IM だけが発現していたことから、IM は HCIIa から、これに対して FM は HCIIb あるいは HCIIId から構成されている可能性が高い。尾部懸垂群にみられた HCIIId あるいは HCIIb が、4 分子の fast type LC と結合し機能しているならば、速筋において示されるように、そのようなアイソミオシン (FM1d-FM3d および FM1b-FM3b) のゲル上における移動速度は本研究で観察された FM よりさらに速いはずであるが (図 3)、それらは FM3a よび FM2a とほぼ同様であった。先行研究と一致して、本研究では尾部懸垂によって LC の分布は変化しないことが示され、これらのことから、新たに発現した HCIIb あるいは HCIIId と結合している 4 分子の LC の内、少なくとも一部は slow type LC であり、そのために速筋における FMds あるいは FMbs とは移動度が異なっただと思われる。また、尾部懸垂群の中には HCIIId を発現しているが、FM が検

出されない個体もあり、これは HCIIId からなるアイソミオシンが含む 4 分子の LC 全てが slow type であり、そのために SM とほぼ同様の移動速度で泳動されたか、あるいはミオシン分子の構成要素として機能していないかのどちらかなのであろう。

本研究の結果は、尾部懸垂により正常な個体では発現していない fast type HC の合成が促進され、少なくともその一部はミオシン分子として機能していることを示唆する。これらの fast type HC は種々の LC と結合し、これまで考えられてきたより多くの種類のアイソミオシンを形成するものと考えられ、懸垂群において FM から IM の間が銀染色に対して濃染される傾向にあったことは (図 2 ; lane 4)、これを裏付ける。多種におよぶアイソミオシンの存在は、筋線維の収縮速度に連続性を持たせることにつながり、多様な生理的な需要に対応することが可能となるのであろう。

## V. 要 約

本研究は種々の電気泳動法を用いて、3 週間の尾部懸垂によるラットヒラメ筋におけるミオシン分子の変化を詳細に検討した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) 懸垂群ではコントロール群と比べて、HCI の割合が減少し、これまで正常なヒラメ筋で認められていなかった HCIIId, HCIIb が発現した。一方、LC の割合には有意な変化は認められなかった。
- 2) コントロール群のヒラメ筋では SM と IM の 2 種類のアイソミオシンが認められた。HCIIa から成っていると考えられる IM の移動速度は、速筋タイプの筋で認められる HCIIa 由来のアイソミオシンのものより遅かった。
- 3) 懸垂群では SM と IM の 2 種類のアイソミオシンが認められたものと、SM と IM の他に FM のアイソミオシンが認められたものがあった。FM を発現していたラットでは HCIIId, HCIIb を発現していたにもかかわらず、FM の移動速度は速筋タイプの筋で認められる

FM1-3d, FM1-3b に相当するアイソミオシンのものとは異なっていた。

ピロリン酸電気泳動の移動速度は LC と HC の両方に影響を受けるので、懸垂によって新たに発現した fast type HC の少なくとも一部はミオシン分子として機能していること、さらにこれまで考えられてきた以上に多種のミオシン分子が存在していることが本研究の結果から示唆された。

(受理日 平成9年2月28日)

### 参 考 文 献

- 1) Pette, D. and Staron, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, (1990), **116**, 1-76.
- 2) Thomason, D. B., Baldwin, K. M. and Herrick, R. E. Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1986), **60**, 1923-1931.
- 3) Fitts, R. H., Metzger, J. M., Riley, D. A. and Unsworth, B. R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J. Appl. Physiol.*, (1986), **60**, 1946-1953.
- 4) Diffie, G. M., Caiozzo, V. J., Herrick, R. E. and Baldwin, K. M. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.*, (1991), **260**, C528-C534.
- 5) Takahashi, H., Wada, M. and Katsuta, S. Expressions of myosin heavy chain IId isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol. Scand.*, (1991), **143**, 131-132.
- 6) Fauteck, S. P. and Kandarian, S. C. Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. *Am. J. Physiol.*, (1995), **268**, C419-C424.
- 7) Thomason, D. B., Herrick, R. E., Surdyka, D. and Baldwin, K. M. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.*, (1987), **63**, 130-137.
- 8) Kirschbaum, B. J., Simoneau, J.-A. and Pette, D. Dynamics of myosin expression during the induced transformation of adult fast-twitch muscle. In: Stockdale, F. and Kedes, L. (eds.), *Cellular and molecular biology of muscle development*. Liss. New York, (1989), pp 461-469.
- 9) Morey-Holton, E. and Wronski, T. J. Animal models for simulating weightlessness. *Physiologist*, (1981), **24**, Suppl., S45-S48.
- 10) 奥本 正, 斉藤綾子, 大森 肇, 勝田 茂. 尾部懸垂によるラットヒラメ筋線維タイプの非均一的变化. *体力科学*, (1995), **44**, 137-146.
- 11) Caiozzo, V. J., Herrick, R. E. and Baldwin, K. M. Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, (1991), **261**, C285-C295.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, (1951), **193**, 265-275.
- 13) Doucet, J. P. and Trifaro, J. M. A discontinuous and highly porous sodium dodecylsulfate-polyacrylamide slab gel system of high resolution. *Anal. Biochem.*, (1988), **168**, 265-271.
- 14) Oakley, R. L., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.*, (1980), **105**, 361-363.
- 15) Kirschbaum, B. J., Simoneau, J.-A., Bar, A., Barton, P. J. R., Buckingham, M. E. and Pette, D. Chronic stimulation-induced changes of myosin light chains at mRNA and protein levels in rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.*, (1989), **179**, 23-29.
- 16) Bar, A., Simoneau, J.-A. and Pette, D. Altered expression of myosin light chain isoforms in chronically stimulated fast-twitch muscle of the rat. *Eur. J. Biochem.*, (1989), **178**, 591-594.
- 17) Cavaille, F., Janmot, C., Ropert, S. and d'Albis, A. Isomyosins of myosin and actin in human, monkey and rat myometrium. Comparison of pregnant and nonpregnant uterus proteins. *Eur. J. Biochem.*, (1986), **160**, 507-513.
- 18) Termin, A. and Pette, D. Myosin heavy-chain-based isomyosins in developing, adult fast-twitch and slow twitch muscles. *Eur. J. Biochem.*, (1991), **195**, 577-584.
- 19) Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K. and Lomo, T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.*, (1990), **10**, 153-160.
- 20) Schiaffino, S. and Reggiani, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, (1994), **77**, 493-501.
- 21) Reiser, P. J., Moss, R. L., Giulian, G. G. and Greaser, M. L. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J. Biol. Chem.*, (1985), **260**, 9077-9080.
- 22) Bottinelli, R., Betto, R., Schiaffino, S. and Reggiani, C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, (1994), **478**, 341-349.
- 23) McDonald, K. S. and Fitts, R. H. Effect of hindlimb unweighting on single soleus fiber maximal shortening velocity and ATPase activity. *J. Appl. Physiol.*, (1993), **74**, 2949-2957.
- 24) Lowey, S., Waller, G. S. and Trybus, K. M. Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. *Nature*, (1993), **365**,



- 454-456.
- 25) Seedorf, K., Seedorf, U. and Pette, D. Coordinate expression of alkali and DTNB myosin light chains during transformation of rabbit fast muscle by chronic stimulation. *FEBS Lett.*, (1983), **158**, 321-324.
- 26) Wada, M., Kikuchi, K. and Katsuta, S. 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. (1992), 309-317.
- 27) Sugiura, T., Matoba, H. and Murakami, N. Myosin light chain patterns in histochemically typed single fibers of the rat skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, (1992), **102 B**, 617-620.
- 28) Staron, R. S. and Pette, D. The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres: rabbit soleus muscle. *Biochem. J.*, (1987), **243**, 687-693.