

ラット骨格筋の組織化学的筋線維組成と ミオシンの重鎖成分組成の関係

北 浦 孝

Relationship of myosin heavy chains composition and histochemical fiber
types composition of rat skeletal muscle.

Takashi Kitaura

(Received April 28, 1990)

Abstract

Muscle compositions showing physiological contractile properties were determined by the fast and slow myosin heavy chains isoforms and were compared to the histochemical muscle fibers composition (% of total number) in serial sections of rats.

Muscles were obtained from a 12-week-old male Sprague-Dawley rat (350g). The soleus, the extensor digitorum longus, the plantaris, the white portion of the vastus lateralis, the red portion of it, and the diaphragm muscles were examined with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The fractionated myosin heavy chain isoforms were quantified with the densitometric method. The histochemical myofibrillar actomyosin ATPase staining identified slow type I and fast type IIA and type IIB fibers with acidic preincubation.

Muscle compositions determined with heavy chain isoforms were similar to the results with histochemical methods. These biochemical results support the use of the histochemical method to examine the sports aptitude of human.

Key Words: Muscle fiber types—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis—
Fast and slow myosin heavy chains—Histochemistry

I 緒 言

ヒトの骨格筋における筋線維タイプの分布比率（筋線維組成）が一流の競技選手の競技成績と密接な関係があるという事実から筋線維組成を調べると言うことがしばしば行われる^{8,11)}。こ

れは筋線維が生理学的な収縮特性という意味において速筋線維と遅筋線維に大別できることに起因する。そしてこの収縮特性を規定しているものは収縮タンパク質の一つで ATP 分解酵素であるミオシン³⁾の異種性であるということがわかっている。すなわち速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの存在様式によって筋線維タイプが決定されるという考えにもとづいて筋線維組成が調べられるのである。ミオシンの分子構造に関する詳細な研究は進歩がめざましく^{12,16)}、その異種性はこれまで基本構造の軽鎖成分の違いで決められることが多かった^{9,10,12)}。しかし、Billetter ら⁵⁾が組織化学的方法による結果がむしろもう一つの重鎖成分と関係が深いことを示唆し、生化学的結果の再吟味が必要となった。以来重鎖成分の重要性を主張する考え方が主流となってきた。そこで今回はスポーツ適正やトレーニング効果を組織化学的方法でより正確に評価するための基礎研究として、ラットの骨格筋の連続切片を利用し従来から行われている組織化学的方法による結果とミオシンの重鎖成分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁷⁾を用いた生化学的方法により解析した場合での結果とを比較検討することを目的として行った。

II 実験方法

骨格筋試料はネブタールで麻酔をした Sprague-Dawley 系 (S-D) 雄ラット (350g) のヒラメ筋 (SDL), 長指伸筋 (EDL), 足底筋 (PLA), 外側広筋赤色部 (RVL), 外側広筋白色部 (WVL), 横隔膜筋 (DPH) から得られた。筋肉は液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結処理をした。凍結した試料はマイクロトーム (-20°C) により厚さ 20 μ m の連続切片を作成し一部を組織化学的分類に使用し、その連続した切片を生化学的分析のために使用した。組織化学的方法は通常の Actomyosin ATPase の活性染色法を用いて行い、速筋型筋線維のサブタイプ分類は pH4.6 の酸性溶液による前処理により行った。ATPase 活性染色後、顕微鏡写真を用いて筋線維組成を算出した。生化学的分類は試料をマイクロガラスホモジナイザーにいれ、SDS-蛋白質処理溶液 (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-ME, 10% glycerol) にて処理をし、95°C で 5 分間の加熱処理を行った。冷却後約 150ng のミオシンを重鎖成分の分析のために SDS-ポリアクリルアミドゲルの試料泳動溝に入れた。

電気泳動はミニスラブゲル電気泳動装置 (マリソル, SE-8012) を用い Carraro & Cantini の方法⁷⁾に従って行った。濃縮ゲルの濃度は T = 4% で分離ゲルは 5% (C = 2.6%) であった。泳動は泳動先端マーカー (0.001% bromphenol blue) が濃縮ゲル中は 40V, 分離ゲル中は 140V の定電圧で約 3 時間室温で行った。泳動後ゲルは Oakley らの方法¹⁴⁾に従って銀染色が施され、その後ミオシン重鎖成分をデンストメーター (550nm) にて定量した。

タンパク質の濃度は Lowry らの方法¹³⁾に従い牛血清アルブミンを標準として決定した。

III 結 果

本実験における基本的手順を図 1 に示した。実験の再現性を保証するために連続切片は組織

化学的分析と生化学的分析用にそれぞれ連続した6-20組の試料が利用された。組織化学的分析の結果得られた筋線維タイプの分布を示す写真のDPHの例を図2に示した。

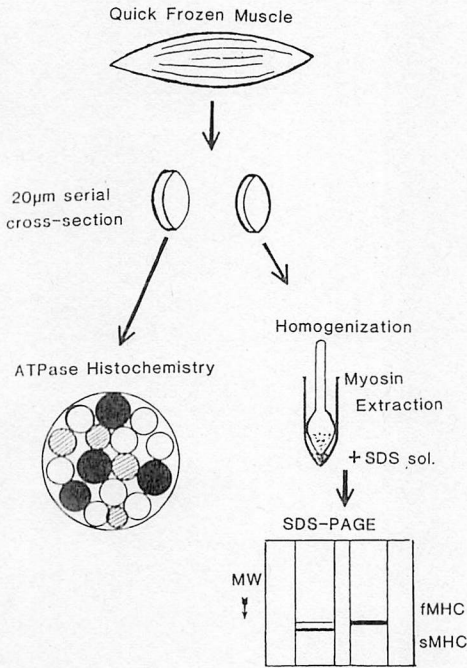


図1 実験の基本的手順

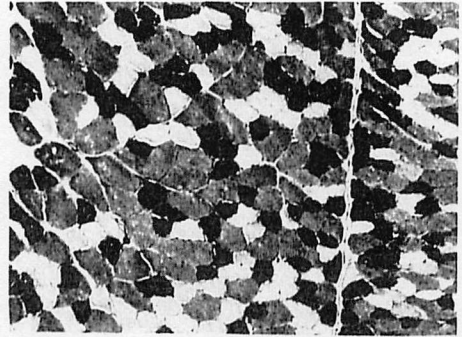


図2 DPH (横隔膜筋)の組織化学的分類の結果最も濃く染まっているのは Type I, 中間的なのは Type II B, 明るいのは Type II Aである。

この図の中で分類できるような筋線維タイプが他の筋肉においても同様に検出されたが、SOLでは速筋型線維は一色に染まりサブタイプの検出は出来なかった。また WVL は全筋線維が単一色に染まった。これらは同一条件下で染色した他の筋肉の結果と比較したところ SOLでは Type II A に相当し WVL では Type II B に相当した。

参考のために現在までに報告されているミオシンのサブユニットのアイソフォームの数を表1に示した。

表1 報告されているミオシンのサブユニットのアイソフォームの数

Distinct vertebrate myosin subunits identified by protein-chemical methods.

Myosin Heavy Chain			Myosin Light Chain				
Source	No.	Reference	Source	No.	Reference		
Skeletal muscle	Fast-twitch	2	Starr and Offer (1973)	Skeletal muscle	Fast-twitch	3	Weeds (1976)
	Slow-twitch	1	Weeds and Burridge (1975)		Slow-twitch	3	Weeds (1976)
	Masseter	1	Rowlerson et al. (1981)		Masseter	2	Rowlerson et al. (1981)
	Embryonic	1	Whalen et al. (1979)		Embryonic	1	Whalen et al. (1978)
	Neonatal	1	Whalen et al. (1981)				
Cardiac muscle	Ventricular	2	Hoh et al. (1979)	Cardiac muscle	Ventricular	2	Whalen et al. (1978)
		1	Flink et al. (1978)	Atrial	2	Whalen et al. (1982)	
Smooth muscle	1	Burridge and Bray (1975)	Smooth muscle	2	Burridge (1974)		
Nonmuscle	2	Burridge and Bray (1975)	Nonmuscle				

(From Susan Lowey, 1986)

全試料の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図 3 に示した。B) の SOL と F) の DPH において遅筋型ミオシン重鎖成分 (sHC) の存在が明瞭に検出できた。

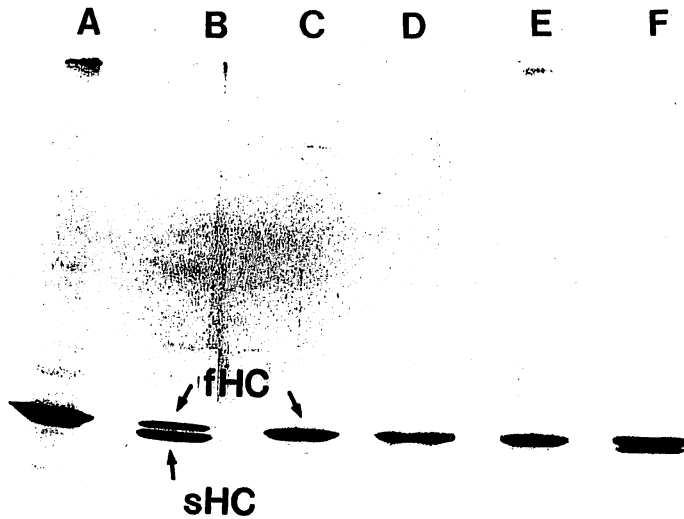


図 3 各筋におけるミオシン重鎖成分の電気泳動による分離結果。
A)EDL: B)SOL: C)WVL: D)PLA: E)RVL: F)DPH

表 2 に組織化学的方法による筋線維組成の結果とミオシン重鎖成分の結果をまとめた。

表 1 で示されているような 2 種類の速筋型のミオシン重鎖成分のアイソフォーム分類が本法

表 2 筋のミオシン重鎖成分の割合と組織化学的筋線維組成

MUSCLE COMPOSITION OF RAT

Muscle	% of total number			% of myosin heavy chain	
	IIB	IIA	I	fHC	sHC
EDL	77	18	5	100	0
SOL		26	74	32	68
PLA	79	12	9	97	3
RVL	55	31	14	95	5
WVL		100	0	100	0
DPH	39	26	35	76	24

では出来ないため組織化学的分類との比較には組織化学的結果の速筋型線維の成分のサブタイプを合計したものと比べる必要がある。その結果、生理学的に速筋と言われる EDL や WVL では生化学的にはほぼ完全に速筋型のミオシンの重鎖成分だけであるのに対し一般に遅筋の代表とされるヒラメ筋は大部分が遅筋型のミオシンであるが若干速筋成分が混在しているのが確認出来た。

IV 考 察

本研究においてミオシン重鎖成分の筋における分布の割合が従来から利用されている組織化学的方法による筋線維組成とかなり近い値を示すことが明らかとなった(表2)。ミオシンの重鎖成分(平均分子量20万の2量体)の割合は軽鎖成分が分子量約2万の4量体と小さいので、それらの分子構造の大きさを考えた場合ミオシンの量を十分に反映していると考えられるのでその割合はミオシンの異種性の割合に等しいと考えることが出来る。ところでこの方法における試料の採取方法を考慮した場合ミオシンの含量というのは3次元的情報の結果であるから数の割合で求められる組織化学的方法による筋線維組成は1次元的情報であり本結果を評価する場合にはそれらの差を慎重に検討してみる必要があると思われた。即ち、組織化学的方法におけるもう一つの筋の特徴を評価する方法は筋線維面積比(例 %ST area)を用いる方法である。これは面積を用いる2次元的情報であり、筋線維が筋の肥大との関係で調べられる場合には必要不可欠の測定因子である。一本の筋線維内におけるミオシンの分布が全ての種類の筋線維において均一であると仮定すれば2次元的情報は3次元の結果と同等であると見なすことが出来る。従って、本研究において得られた結果は1次元と2次元の結果がほぼ等しいことを意味していると考えられる。即ち、ここに採用した組織化学的方法による結果は速筋線維と遅筋線維において一本の筋線維の面積はほぼ等しい、換言すれば直径がほぼ等しいということを示唆している可能性がある。逆に表2における組織化学と生化学における結果の若干の違いは筋線維の面積の違いに起因しているものと考えられる。

全筋の収縮特性における特徴を明らかにする場合 Bárányi によれば³⁾それはミオシンの ATPase 活性によって決定されるのであるから速筋型のミオシンと遅筋型のミオシンの含量を正確に定量することが重要になってくる。このことは先述したように組織化学的方法を採用する場合筋線維面積比がたんなる筋線維組成で全筋を評価するよりも信頼度が高いと言うことを意味しており、筋線維の直径に違いがある場合にはより重要となる。今回の電気泳動的方法ではそれらを直接的に求められる利点があることが判明した。しかし、表1で示したようにミオシンのタイプを決定するにはまだいくつかの問題点が残されている。それはミオシンを構成するサブユニットに異種のもの、つまりアイソフォームが複数存在し、単なる速筋型と遅筋型に二分出来ない可能性があることである。従って、ミオシンと組織化学的結果が正しく評価されるためには Billeter ら⁵⁾によって示された組織化学的結果とミオシンの対応が更に多くのデータによって支持される必要があると思われる¹¹⁾。組織化学的分析方法にはまだ代謝特性を加味した分類方法(FG・FOG・SO)があるところからまたその吟味も必要であると思われ

る^{1,6,15)}。Bettoら⁴⁾(1986)は単一筋線維の中に速筋型と遅筋型の両型のみオシンの重鎖成分の混在や速筋型ミオシンのサブタイプの混在が存在することを示しているし、Bar & Petteは速筋型ミオシンとしてTypeIIDの存在をも電気泳動的に示した²⁾。これらの結果は生理学的にも生化学的にも組織化学的分類による評価を更に困難にする見解であるが筋肉の基本的な性質を決定する上で重要な報告でもある。従ってこれらの結果を従来の組織化学的分類との関係において明らかにして行くことはスポーツ科学の中で筋の特徴を正確に理解するための今後の重要な研究課題であると思われる。

文 献

- 1) Ariano, M. A., R. B. Armstrong and V. R. Edgerton (1973) : Hindlimb muscle fiber population of five mammals. *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 51-55.
- 2) Bar, A., and Pette, D. (1988) : Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 235, 153-155.
- 3) Barany, M. (1967) : ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, 50, 197-218.
- 4) Betto, D. D., E. Zerbato and R. Betto (1986) : Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 138 (2), 981-987.
- 5) Billeter, R., C. W. Heizmann, H. Howald, and E. Jenny (1981) : Analysis of myosin light chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.*, 116, 389-395.
- 6) Carraro, U., L. Dalla Libera, C. Cantini and D. Danieli-Betto (1982) : Chronic denervation of rat diaphragm : Selective maintenance of adult fast myosin heavy chains. *Muscle & Nerve*, 5, 515-524.
- 7) Carraro, U., and C. Cantini (1983) : A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 793-802.
- 8) 勝田 茂, 和田正信(1986) : 筋線維組成と運動競技適性. *デサントスポーツ科学*, 7, 34-43.
- 9) Kitaura, T., T. Ishiko and T. Mikawa (1983) : Classification of single muscle fibers in mouse soleus and extensor digitorum longus muscles with myosin light chains. *体力科学*, 32, 32-36.
- 10) 北浦 孝 (1984) : 骨格筋のFiber typeとMyosinの関係. *体育の科学*, 34, 109-112.
- 11) 北浦 孝 (1984) : 筋線維分類とスポーツ. *臨床スポーツ医学*, 1, 619-623.
- 12) Lowey, S. (1986) : Cardiac and skeletal muscle myosin polymorphism. *Med. Sci. Sports exerc.*, 18 (3), 284-291.
- 13) Lowry, O. H., A. L. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 14) Oakley, B. R., D. R. Kirsh, and N. R. Morris (1980) : A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105, 361-363.
- 15) Saubert IV, C. W., R. B. Armstrong, R. E. Shepherd and P. D. Gollnick (1973) : Anaerobic enzyme adaptations to sprint training. *Pflugers Arch.*, 341, 305-312.
- 16) 山本啓一 (1986) : ミオシンの構造と働き. *現代化学*, 188, 41-44.