

二次元電気泳動法による発育期ラット骨格筋タンパクの変化

和田 正信* 宮原 英昭** 勝田 茂*

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF MYOPROTEINS IN DEVELOPING RAT SKELETAL MUSCLE

MASANOBU WADA, HIDEAKI MIYAHARA and SHIGERU KATSUTA

Abstract

Changes in myoproteins during development of rat skeletal muscle were investigated using two-dimensional gel electrophoresis. In M. soleus (SOL) which in adult, is composed predominantly of slow twitch fibers, fast type myosin light chains (fLC) were the major species and slow type light chains (sLC) were the minor species at birth. During development, the replacement rate of fLC to sLC sequentially occurred so that LC patterns at 21 days postpartum were similar to adult where fLC were difficult to visualize. In contrast, M. extensor digitorum longus (EDL) always contained dominant fLC although sLC were found only for 5~9 days. LC 3f became detectable at 5 days and gradually increased. In α -tropomyosin there were isozymes of fast and slow type based on difference in molecular weight, but not in β -tropomyosin. Changes in isozymes of α -tropomyosin approximately corresponded with that in isozymes (fast and slow type) of LC in both EDL and SOL. During adult stage following birth, in EDL creatine kinase underwent a three-fold increase in molecular ratio to actin, whereas in SOL there was little change though increase took place transiently. These results suggest that with development many myoproteins change more dramatically in slow muscle than in fast muscle, and that transitions in LC isozymes and changes in distribution of histochemically typed muscle fibers may follow different time courses.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 1988, 37 : 172~182)

key words : 1) two-dimensional gel electrophoresis, 2) myoprotein, 3) myosin light chain, 4) isozyme, 5) tropomyosin

I. 緒 言

脊椎動物の骨格筋線維は個体発生から成熟期に至る発育過程において、速筋線維と遅筋線維に分化するが^{9,12,15,23)}、この過程には、神経性因子³⁾、筋原性因子³²⁾、あるいはホルモン性因子^{13,29)}、など様々な要因が関与している。

筋を支配する神経をつなぎかえる、いわゆる交叉神経支配を施すと再神経支配された運動ニューロンに依存して、筋線維タイプに変換が認められること²⁶⁾、ひとつの運動単位に属する筋線維はすべて同一のタイプであること^{8,17)}などから、成熟

した個体では筋線維の特性は支配運動ニューロンの特性により二次的に決定されると考えられている。また発育期においても、筋線維の機能的・構造的特性に顕著な特異性が発現し始める時期と多重神経支配から単一神経支配へと移行する時期とがほぼ一致することが報告されており^{3,5,19)}、神経性因子が筋線維に及ぼす影響は極めて大きく、その傾向は life span すべてを通じて変わらないであろうと推察される。

一方筋原性因子について Rubinstein and Kelly³²⁾は、胎生期において最初に発生する大型の筋細胞 (Primary generation cell) は例外なく

*筑波大学体育科学系

〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

**出水市立出水中学校

〒889-02 鹿児島県出水市向江町9-40 (899-02)

Institute of Health and Sports Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tsukuba-shi Ibaraki (305)

Izumi Junior High School, 9-40 Mukae-cho, Izumi-shi, Kagoshima

(899-02)

遅筋線維へと分化することを、またホルモン性因子について Iannuzo et al.¹³⁾ および Pope and Weeds²⁹⁾ は、甲状腺ホルモンの不足が筋線維組成の移行の誘因刺激になることを報告している。したがって筋の発育変化に関して、神経性因子以外の要因についても十分検討しなければならないが、これらはひとつひとつが独立して機能するわけではなく、複雑な相互作用の結果として筋の分化は進行するため、その機序については不明な点が多い。

これまでの研究^{9,12)} では、筋細胞内における変化の指標としてタンパクの分子種の消長およびその分布を主に用いてきたが、多くはごく少数のタンパク、その中でも収縮特性との関わりあいからミオシン分子に焦点をあてたもの^{12,19,27)} であり、筋タンパク全体としてみた動向についての報告はまだなされていない。さらにミオシン分子の発育変化に関するこれらの報告は、出生後の一時期と成熟期とを比較したものが多く、分化の過程を詳細に検討した研究^{6,32)} は少ない。

そこで本研究では、ウィスター系雄ラットを用い生後発育にとまなう骨格筋タンパクの変化の詳細を、未分化な筋線維が多く存在する^{15,31)} と考えられる時期を中心に電気泳動学的に検討することを目的とした。

II. 実験方法

A. 実験動物および被検筋

実験材料には Wistar 系雄ラット、生後 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 日齢および 8, 18 週齢各 2 匹ずつを用いた。それぞれの日齢および週齢に屠殺し、下肢よりヒラメ筋 (M. soleus; 以後 SOL と略す) および長指伸筋 (M. extensor digitorum longus; 以後 EDL と略す) を摘出した。これらは電気泳動を実施するまで液体窒素中に保存された。

B. 電気泳動

電気泳動は、Hirabayashi¹¹⁾ の方法にしたがい次の手順で行った。まずグアニジン抽出液 (8 M guanidine hydrochloride, 0.05 M Tris-HCl; pH 7.5, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01 M sodium

pyrophosphate) を用い、タンパク量が十分でない 19 日齢までは 20 倍、それ以降は 40 倍で抽出し、ガラスホモジナイザー中で均質化した。得られた抽出液をセロファンチューブに入れ、4℃の透析液 (5 M urea, 1 M thiourea, 0.17% 2-mercaptoethanol, 0.15 M sodium pyrophosphate) 中で 4 時間透析した後、マイクロ二次元電気泳動に供した。

一次元目は、毛細管中に積まれたアガロースゲル (pH 2.5~10.5) による等電点電気泳動法である。泳動は 4℃・200 V で開始し、計 1,200 V・時間行った。通電後、シャーレにゲルを移し、固定液 (10% trichloroacetic acid, 5% sulfosalicylic acid) 中に数分浸した。

二次元目の泳動として、高さ約 6 cm 幅約 22 cm の泳動槽を用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; 以後 SDS-PAGE と略す) を室温で行った。分子量の大きく異なる種々のタンパクを分離するため、ゲル中のアクリルアミドには、上から下へ 12~20% の濃度勾配をつけた。通電は濃縮ゲル中は 30 mA、分離ゲル中は 60 mA で実施した。

ゲルの染色には、クーマジープリリアントブルー染色 (0.1% coomassie brilliant blue R. 50% trichloroacetic acid) を用いた。約 5 時間染色した後、脱色 (25% methanol, 10% acetic acid) した。

得られた泳動パターンより、アクチン、ミオシン軽鎖 (Light Chain; 以後 LC と略す)、トロポミオシン (Tropomyosin; 以後 TM と略す)、およびクレアチンキナーゼ (Creatine Kinase; 以後 CK と略す) の各成分を Giometti et al.¹⁰⁾ の報告に基づき同定・定量した。定量には画像解析システム (NEC 社製 PC 8001 MKII, 日本ピーシーシステムズ社製 TV 写楽) を用いた。これは画面に写されたタンパクのスポットの画像を輝度別に 16 種類に分け、その面積の合計と係数から濃度を測定する方法であり、二次元像からのタンパクの定量を容易に行うことのできるシステムである。

また、全タンパクに対するアクチンの相対重量比を算出するために、SDS-PAGE のみの一次元

電気泳動を実施し, デンシトメーター (富士理研社製 Fuji densitometer FD-AIV) を用い全タンパク量を測定した。

III. 実験結果

A. 成熟期における泳動パターン

図1に18週齢のラットにおける SOL(a)および EDL(b)の泳動パターンを示した。遅筋である SOL と速筋である EDL とでは基本的には同様のパターンが得られたが, 分子種およびタンパク量にいくつかの違いが観察された。

まず LC についてみると, SOL では slow type LC (LC1s, LC2s) のみが, これとは対照的に EDL では fast type LC (LC1f, LC2f, LC3f) のみが分画された。α-TM にも LC と同様に fast type と slow type とがみられ, それらの分

子量は, 両者が同時に検出される発育期のパターンに示されるように (図2, 図3), slow type のほうが大きいことが認められた。また, CK および解糖系酵素であるアルドラーゼにも顕著な差異が示され, SOL より EDL において多くを含有している傾向にあった。

B. 発育にともなう各タンパクの変化

1. ミオシン軽鎖

図2に SOL, 図3に EDL における発育にともなう泳動パターンの変化を示した。これらから, 画像解析装置により求めた各日齢および週齢における LC の分子種の重量比を示したものが図4および図5である。

SOL では出生直後には fast type LC (LC1f, LC2f) の占有率が高く (図4), 全体の約75%を占めていた。これらは日齢がすすむにつれ減少

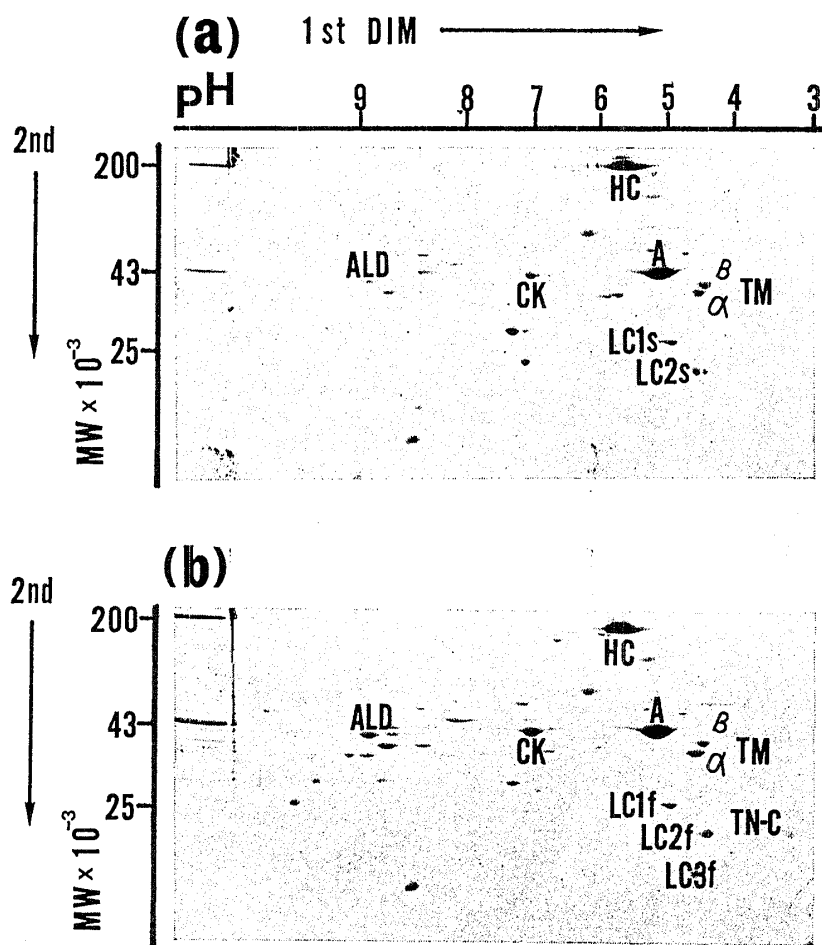


Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic patterns of total proteins from SOL(a) and EDL(b) in adult rat. HC, Myosin heavy chain; A, Actin; TM, Tropomyosin; TN-C, Troponin-C; LC, Myosin light chain; CK, Creatine kinase; ALD, Aldolase.

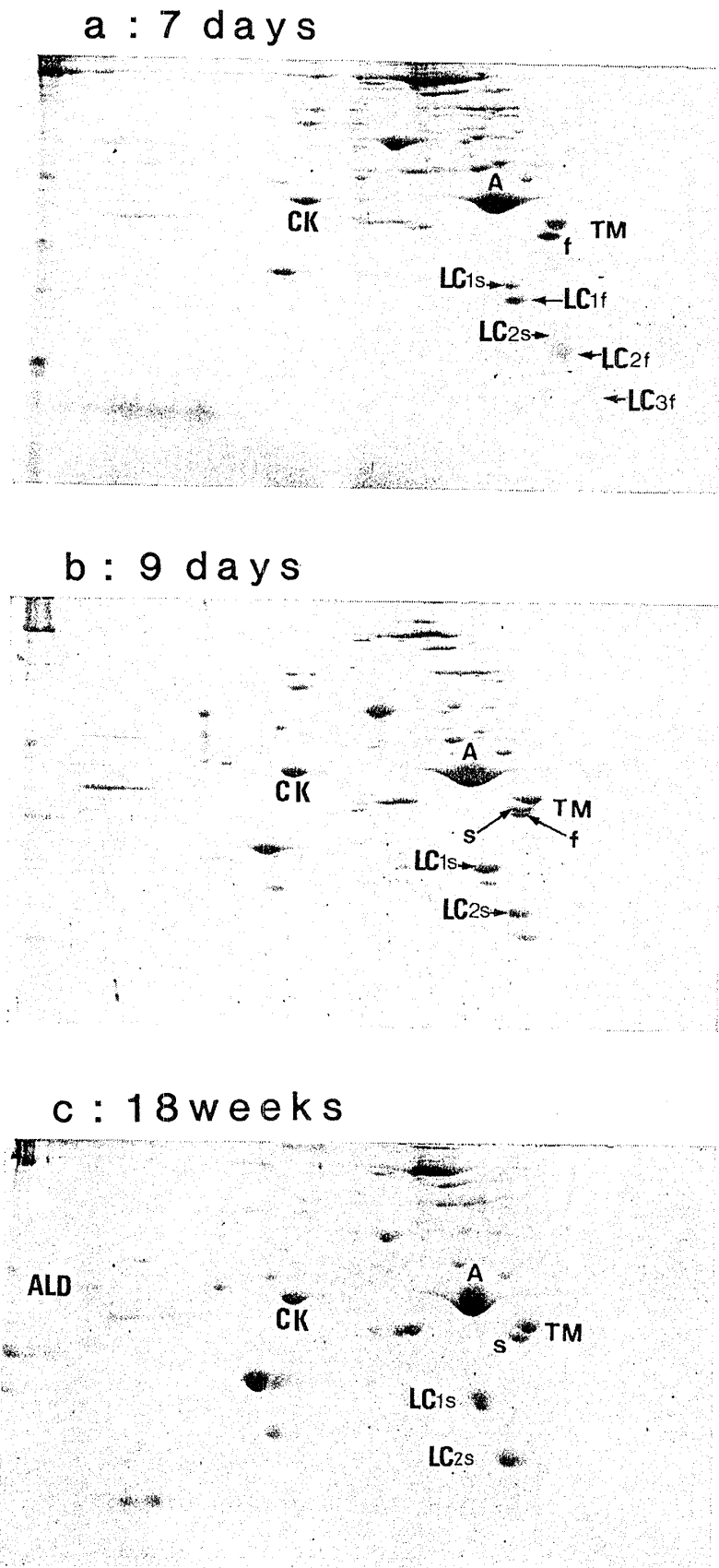
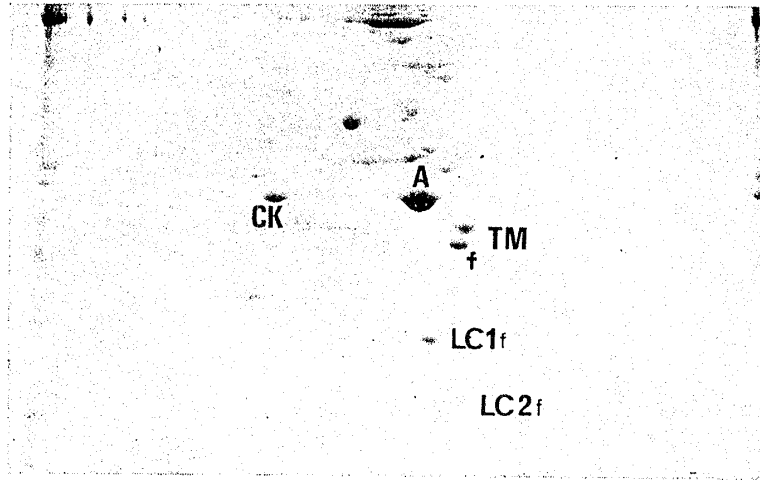
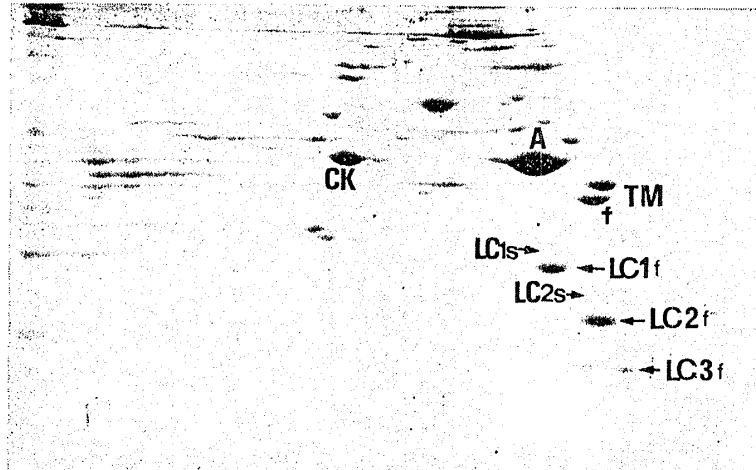


Fig. 2. Two-dimensional electrophoretic patterns of total proteins in SOL at the different ages. a, 7 days postpartum ; b, 9 days postpartum ; c, 18 weeks postpartum.

a : 5 days



b : 17 days



c : 18 weeks

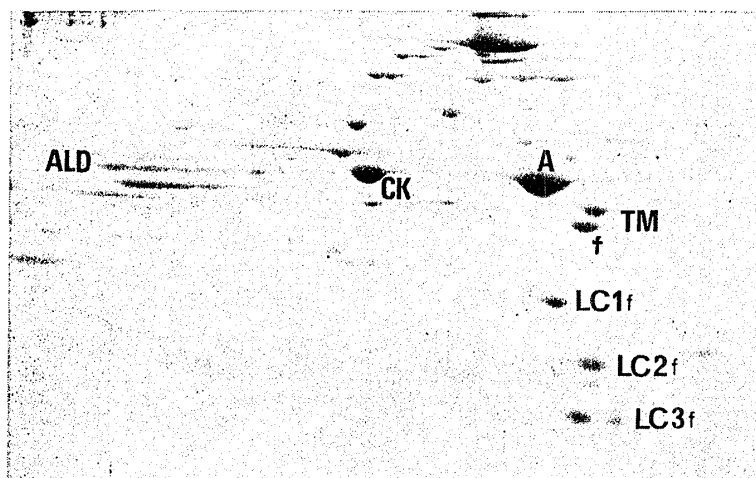


Fig. 3. Two-dimensional electrophoretic patterns of total proteins in EDL at the different ages. a, 5 days postpartum ; b, 17 days post postpartum ; c, 18 weeks postpartum.

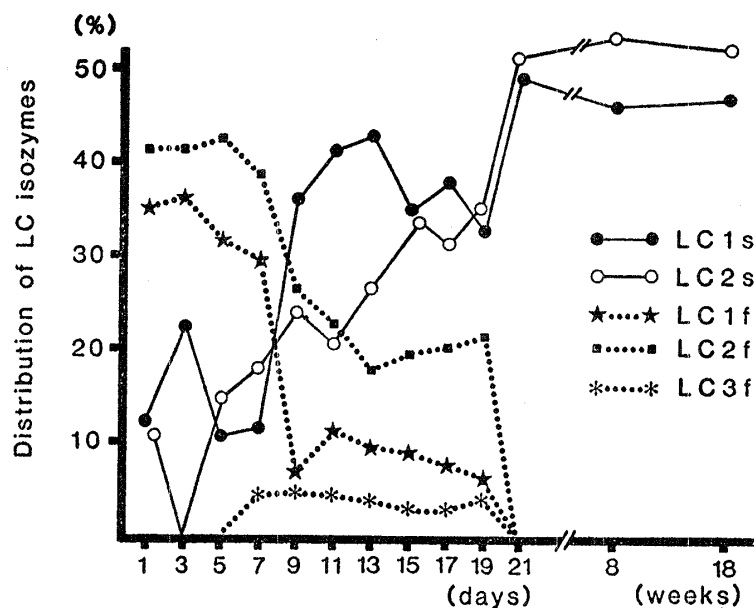


Fig. 4. Changes in distribution of myosin light chain isozyms from SOL during development.

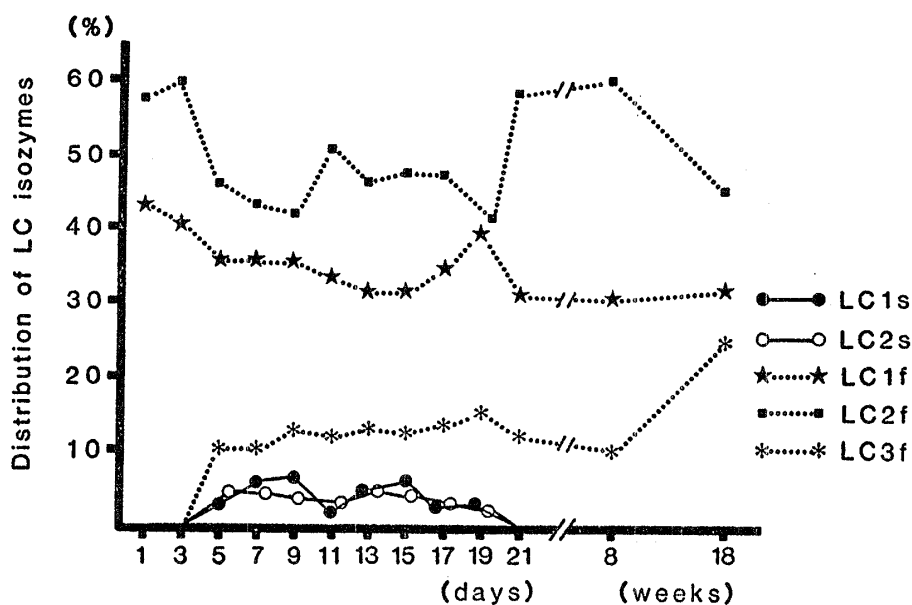


Fig. 5. Changes in distribution of myosin light chain isozyms from EDL during development.

し、代わって slow type LC の増加がみられ、両者の割合が逆転したのは9日齢であった。21日齢以降は slow type LC (LC1s, LC2s) のみが検出された。LC3f は7日齢から19日齢の間、わずかなではあるがほぼ一定の割合で検出された。

一方 EDL では SOL ほど著しい変動はみられなかった(図5)。この筋では fast type LC の占有率が常に高く、slow type LC が検出されたのは5日齢から19日齢の間だけであった。LC3f は

5日齢以降認められ、8週齢までは全 LC の約10%を占めるにすぎなかったが、18週齢では24.2%にまで増加した。

2. トロポミオシン

α -TM と β -TM の重量比は、両筋とも全ての期間を通じてほぼ1:1で一定であった(図2, 図3)。fast type と slow type の分子種が認められた α -TM は、SOL では誕生時 fast type しか分画されなかったが、5日齢から fast type に加

え, slow type がみられるようになり, 以後漸次 slow type の増加, fast type の減少が観察され, 8週齢以降では slow type のみとなった(図2). 一方 EDL では, slow type はみられず常に fast type のみが検出された(図3).

3. アクチン

本研究で用いた電気泳動法では, 筋の試料が微量であること, および一次元目の泳動の際毛細管に注入する抽出液の量を一定に保てないことから, 分画する全タンパク量を厳密に規定することはできなかった. したがって解析された各タンパク量の絶対値の比較によって, 発育にともなう量

的な変化を検討することはできない.

そこで, 常に安定したパターンが得られたアクチンに対する相対値を用いることによって, この問題の解決を図ろうと考えたが, この場合, 全タンパク量に対するアクチンの比率 (Ratio of actin to total proteins; 以後 A/TP と略す) の変化を把握する必要がある. そこで SDS-PAGE のみの一次元電気泳動を行い, 得られた泳動パターンから A/TP を算出し, その結果を図6に示した.

SOL, EDL いずれにおいても発育にともない若干増加する傾向にあったが, 著しい変化は認められなかった.

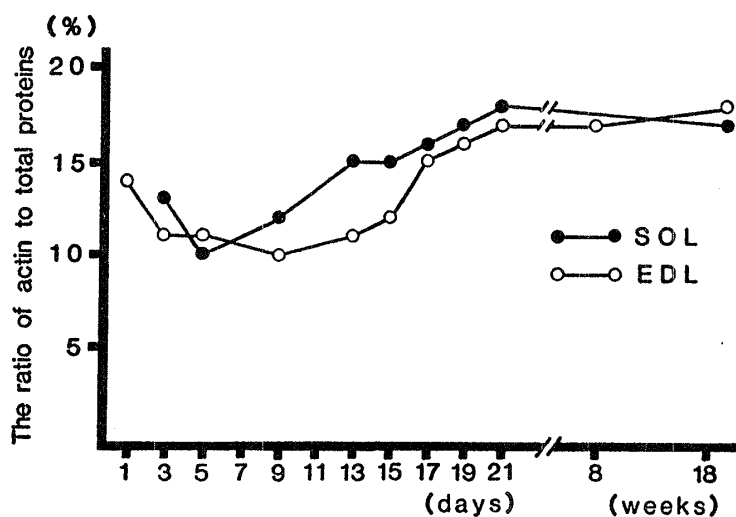


Fig. 6. Changes in molecular ratio of actin to total proteins during development.

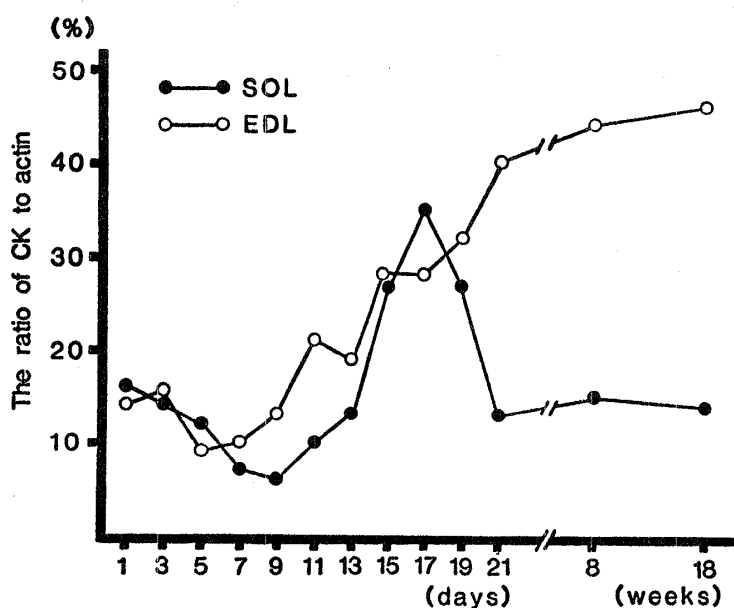


Fig. 7. Changes in molecular ratio of creatine kinase to actin during development.

4. クレアチンキナーゼ

図7に発育にともなうアクチンに対するCKの重量比の変化を示した。

17日齢までは、SOL, EDLともにほぼ同様の推移をたどり、1日齢から5~9日齢までは減少し、以後顕著に増加した。19日齢以降においては、EDLでは引き続き増加する傾向にあり、18週齢の値は1日齢の約3倍であった。一方、SOLでは、EDLとは対照的に著しい減少をみせ、1日齢とほぼ同様の値に収束した。

IV. 考 察

LCの分子量は2万前後と比較的小さいため、電気泳動による解析が容易であり、各筋線維タイプにおける分子種の分布について多くの報告がなされているが、その見解は必ずしも一致していない。

Pette and Schnez²⁸⁾および Weeds and Hall³⁸⁾は、ラビットにおいて遅筋線維にはslow type LCが、速筋線維にはfast type LCが特異的に分布していることを報告しているが、その一方で Sugiura et al.³⁵⁾および Mizusawa et al.²¹⁾はラットにおいて、また Billeter et al.⁴⁾はヒトにおいて、単一筋線維内に両タイプの分子種が混在していることを確認している。これらに加え組織化学的に同定される筋線維タイプは、ミオシン重鎖(Heavy Chain; 以後 HC と略す)の特性に依存するとする Staron and Pette³³⁾の報告は、Myosin ATPase 活性はLCではなくHCによって決定されることを示すものである。

しかしながら Alkali LC (LC1, LC3)はミオシンのATPの加水分解には直接関与しないものの、アクトミオシンからのADPの解離速度を規定しActin-activated ATPase 活性に影響を及ぼすこと³⁷⁾、またミオシン分子の多くはfast type HCにはfast type LCが、slow type HCにはslow type LCが結合した形で存在していることから、LCの分子種の分布は生体内におけるミオシンの機能的特性を反映するものと考えられる。

ラットの骨格筋線維は、生下時においては生化学的^{2,6,27,30)}、組織化学的^{9,15)}、生理学的⁵⁾に未分

化な状態にあり、生後発育にともない成熟期にみられる特徴的な性質を有するようになる。

胎生期におけるSOLでは、fast type LCとslow type LCの両分子種が検出され、生後漸次fast type LCが減少、slow type LCが増加することが報告されているが^{6,27,30,31)}、Gauthier et al.⁹⁾によれば、このような変化はfast type ミオシンを含む筋線維が新生するためではなく、単一筋線維内で両タイプのミオシンが発現していたものが、fast type ミオシンの合成が抑制されるようになることに起因するとしている。本研究においてもこれらと一致した結果が得られたが、21日齢まで隔日にLC分子種の分布を観察したところ、7日齢から9日齢にかけて他の期間と比べfast type LCが著明に減少することが認められた(図4)。

Kelly and Rubinstein¹⁶⁾は筋線維の分化に、筋線維鞘上に存在する粘着分子であるN-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule)が不可欠であり、ラットではこのタンパクが消失する9日齢²²⁾でfast type ミオシンの占有率の高いSecondary generation cellの分裂が停止すると指摘している。また石原ら¹⁵⁾は、生後7日齢で脊髄神経細胞の組織化学的分化が認められることを報告しており、これらの要因が9日齢にみられたfast type LCの著しい減少に関与しているものと推察される。

Kugelberg¹⁷⁾は姿勢保持などの緊張性収縮を強いられるSOLでは他の筋と比べ分化の完了する時期が遅く、体重の増加にともないType I線維の相対的な増加が続くことをラットにおいて報告しているが、老齢ラットで示されるようにType II線維は完全に消失するわけではない。したがって、他の筋とは異なりSOLのType II線維の多くがLCに関してfast typeとslow typeの混在型であったとしても^{33,34)}、この筋にはわずかながらfast type LCが常に存在するはずである。

本研究において21日齢以降fast type LCが検出されなかったのは、クーマジーブリアントブルー染色より感度の高い銀染色を施すとこれらが

分画されたことから(未発表資料), 用いた泳動法の分解能に問題があったものと考えられる. 21日齢以降の EDL において slow type LC が検出されなかったのも同様の理由によるであろう.

SOL にみられた顕著な変化とは対照的に, EDL では Pelloni-Muller et al.²⁷⁾, Roy et al.³⁰⁾ および Gauthier et al.⁹⁾ の報告と一致して, 幼若期においても成熟期とほぼ同様の LC パターンが観察された(図 5).

しかしこの時期の収縮速度は成熟期と比べ著しく遅く⁵⁾, 成熟期とは異なり LC 分子種と機能的特性との間に相関関係が認められていない. 成沢²⁴⁾ は出生直後のラットでは, フィラメントの走行方向が不揃いであることを, また Hoh and Teoh¹²⁾ は幼若期の HC は, 成熟期の fast type HC および slow type HC のいずれのものともポリペプチドの配列が異なることを報告している. さらにミオシン ATPase 活性や解糖系酵素の活性も幼若期では低いとされており^{1,7)}, この時期の収縮速度は LC 分子種以外の多くの要因により規定されると考えられる. Hoh and Yeoh¹²⁾ が報告する幼若期の HC は, 成熟期のラットにおいても再生中の筋に出現し²⁰⁾, これらはおそらく発生過程における一過性の発現タンパクとして, 遺伝的にプログラミングされているものであろう.

図 5 にみられる発育にともなう LC3f の増加は Roy et al.³⁰⁾ および Gauthier et al.⁹⁾ も指摘するところであるが, その生理的な意義については Thomason et al.³⁶⁾ の報告から示唆が与えられる. 彼らによると LC3f 2 モルからなるミオシン FM1 は, LC1f 2 モルからなる FM3 より myofibril ATPase 活性が高いとしており, したがって LC3f の増加は ATP の分解速度の増加を示すものと考えられ, このことは CK の増加と合わせ(図 7), 嫌気的な代謝に関する筋線維の変化を示唆するものと推察される.

本研究では, 5日齢から19日齢までの間 slow type LC が観察されたが, 同様な報告は鳥類ではなされているものの⁶⁾ げっ歯類ではみられず, この理由についてはよく分らない.

筋線維の特性が支配を受ける運動神経細胞の特

性に従属的であることは, 多くの研究結果から一般に受け入れられている^{8,14,15,17,26)}. しかしながら, Laing and Lamb¹⁸⁾ は神経-筋接合が確立される以前のニワトリの翼の筋を腰部に移植したところ, それらは腰部運動神経細胞に支配されたにもかかわらず正常な筋と同様の発育変化を示したことを報告している. また発育期における甲状腺ホルモンの不足は, 筋重量の増加といった量的側面のみならずミオシン ATPase 活性, 筋小胞体の機能, ミトコンドリアの酸化能力といった質的側面の変化にも影響を及ぼすとされている^{1,2,23)}. さらに図 4 および図 7 に示されるように LC パターンおよび CK の変化は, 単一神経支配が確立する⁹⁾ 以前にすでに進行していることが認められ, Rubinstein and Kelly³²⁾ が指摘するように, 発育期初期では筋線維の分化過程に, 神経性以外の要因, すなわち筋原性因子, ホルモン性因子などが成熟期と比べより多く寄与している可能性が大きい.

これまで述べてきた発育にともなう LC の変化は, 石原ら^{14,15)} の報告する筋線維タイプの移行と並行して起こるわけではない. とくに SOL では, ミオシン ATPase の染色パターンに特異性がみられ始める 7 日齢以前¹⁵⁾ で, すでに LC 分子種の分布に変化が認められること, ならびに 3 週齢以降においても Type II 線維から Type I 線維への交換が引き続き生じているにもかかわらず^{14,17)}, この時期の LC パターンは成熟期のものとほぼ同様であることが明らかとなり(図 4), 少なくともこの筋においては, LC の分子種の分布と組織化学的に同定される筋線維タイプとの間に必ずしも密接な関係が存在しないことが示唆された.

なお, トロポミオシンやトロポニン C にも変化がみられたが, これらが筋の機能に及ぼす影響については今後の研究課題として残された.

V. 総 括

本研究は発育にともなう骨格筋タンパクの変化を検討することを目的として, 1日齢から21日齢および 8, 18週齢のウィスター系雄ラット 26 匹を用い, 二次元電気泳動法により各タンパクを定量

したところ以下の結果を得た。

1) ミオシン軽鎖 (LC) はヒラメ筋では、発育にともない fast type 優位から slow type 優位へと移行し、21日齢以降においては fast type LC は検出されなくなった。一方長指伸筋では、5日齢から19日齢の間 slow type LC がみられたがその量はわずかであり、fast type LC の占有率が常に高かった。

2) トロポミオシン(TM)は、 α -TM に fast type と slow type とがみられ、ヒラメ筋では誕生時 fast type だけがみられたが、5日齢から slow type が検出されるようになり、以後 slow type の占有率が増し、成熟期では fast type はみられなくなった。長指伸筋では全ての期間において fast type だけがみられた。

3) クレアチンキナーゼは、生下時と成熟期の値を比較すると、ヒラメ筋ではほぼ同様であったが、長指伸筋では発育にともない約3倍に増加した。

これらのことから、発育にともなって骨格筋タンパクの多くは遅筋において顕著に変化することが示唆され、それらは組織化学的に同定される筋線維タイプの変化と必ずしも並行して起こるのではないであろうと推察される。

本研究は、昭和59・60年度文部省科学研究費補助金・一般研究C (課題番号 59580072) および昭和60年度筑波大学学内プロジェクト研究・助成研究 (研究代表者: 勝田 茂) により行った。

研究を進めるにあたって終始御助力をいただいた筑波大学生物科学系平林民雄教授に感謝します。

(受付 昭和62年8月10日)

参 考 文 献

- Baldwin, K. M. (1984) : Muscle development neonatal to adult. *Ex. Sports Sci. Rev.* **12**, 1-19.
- Baldwin, K. M., Hooker, A. M., Campbell, P. J. and Lewis, R. E. (1978) : Enzyme changes in neonatal skeletal muscle : effect of thyroid deficiency. *Am. J. Physiol.* **235**, C 97-C 102.
- Bennett, M. R. and Pettigrew, A. G. (1974) : The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol.* **241**, 515-545.
- Billeter, R., Heizmann, C. W., Howald, H. and Jenny, E. (1981) : Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.* **116**, 389-395.
- Close, R. (1964) : Dynamic properties of fast and slow skeletal muscle of the rat during development. *J. Physiol.* **173**, 74-95.
- Crow, M. T., Olson, P. S. and Stockdale, F. E. (1983) : Myosin light-chain expression during avian muscle development. *J. Cell. Biol.* **96**, 736-744.
- Drachman, D. B. and Johnston, D. M. (1973) : Development of a mammalian fast muscle : Dynamic and biochemical properties correlated. *J. Physiol.* **234**, 29-42.
- Garnette, R. A. F., O'Donovan, M. J., Stephens, J. A. and Talor, A. (1979) : Motor unit organization of human medial gastrocnemius. *J. Physiol.* **287**, 33-43.
- Gauthier, G. F., Lowey, S. and Hobbs, A. W. (1978) : Fast and slow myosin in developing muscle fibres. *Nature* **274**, 25-29.
- Giometti, C. S., Barany, M., Danon, M. J. and Anderson, N. G. (1980) : Muscle protein analysis II. Two-dimensional electrophoresis of normal and diseased human skeletal muscle. *Clin. Chem.* **26**, 1152-1155.
- Hirabayashi, T. (1981) : Two-dimensional gel electrophoresis of chicken skeletal muscle proteins with agarose gels in the first dimension. *Analyt. Biochem.* **117**, 443-451.
- Hoh, J. F. Y. and Teoh, G. P. S. (1979) : Rabbit skeletal myosin isoenzymes from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscle. *Nature* **280**, 321-323.
- Ianuzzo, C., Patel, P., Chen, V., O'Brien, P. and Williams, C. (1977) : Thyroidal trophic influences on skeletal muscle protein. *Nature* **270**, 74-76.
- 石原昭彦, 勝田 茂, 藤田紀盛(1984) : 発育にともなうラット神経, 筋組織の組織化学的特性の変化について. *体育学研究*, **29**, 125-133.
- 石原昭彦, 志手典之, 勝田 茂, 藤田紀盛(1985) : ラットの脊髄前角細胞と下肢骨格筋線維の分化に関

- する組織化学的研究. 体力科学, 34, 98-107.
- 16) Kelly, A. M. and Rubinstein, N. A. (1986): Development of neuromuscular specialization. *Med. Sci. Sports Exerc.* 18, 292-298.
 - 17) Kugelberg, E. (1976): Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth. *J. Neurol. Sci.* 27, 269-289.
 - 18) Laing, N. G. and Lamb, A. H. (1983): The distribution of muscle fiber types on chick embryo wings transplanted to the pelvic region is normal. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 78, 67-82.
 - 19) Lyons, G., Kelly, A. M. and Rubinstein, N. A. (1983): Myosin transitions in developing fast and slow muscles of the rat hind limb. *Differentiation* 25, 168-175.
 - 20) Marechal, G., Schwartz, K., Beckers-Bleuky, G. and Ghins, E. (1984): Isozymes of myosin in growing and regenerating rat muscles. *Eur. J. Biochem.* 138, 421-428.
 - 21) Mizusawa, H., Takagi, A., Sugita, H. and Yokokura, Y. (1982): Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J. Biochem.* 91, 423-425.
 - 22) Moore, S. E. and Walsh, F. S. (1985): Specific regulation of N-CAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO. J.* 4, 623-630.
 - 23) Morkin, E., Flink, I. L. and Goldman, S. (1983): Biochemical and physiological effects of thyroid hormone on cardiac performance. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 25, 435-463.
 - 24) 成沢三雄(1981): 発育に伴うラット骨格筋線維数の変動. 体力科学, 30, 103-113.
 - 25) Obinata, T., Masaki, T. and Takano, H. (1980): Types of myosin light chains present during the development of fast skeletal muscle in chick embryo. *J. Biochem.* 87, 81-88.
 - 26) 小沢二郎, 嶋田 裕, 真崎知生編(1983): 筋発生の細胞生物学, 初版. 学会センター, 310-311.
 - 27) Pelloni-Muller, G., Ermini, M. and Jenny, E. (1976): Changes in myosin light and heavy chain stoichiometry during development of rabbit fast, slow and cardiac muscles. *FEBS Lett.* 70, 113-117.
 - 28) Pette, D. and Schnez, U. (1977): Myosin light chain patterns of individual fast and slow twitch fibres of rabbit muscles. *Histochemistry* 54, 97-107.
 - 29) Pope, B. and Weeds, G. (1980): Changes in myosin light chains in the rat soleus after thyroidectomy. *FEBS Lett.* 110, 230-235.
 - 30) Roy, R. K., Sreter, F. A. and Sarkar, S. (1979): Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Develop. Biol.* 69, 15-30.
 - 31) Rubinstein, N. A. and Kelly, A. M. (1978): Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat. *Develop. Biol.* 62, 473-485.
 - 32) Rubinstein, N. A. and Kelly, A. M. (1981): Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *J. Cell. Biol.* 90, 128-144.
 - 33) Staron, R. S. and Pette, D. (1987): The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibers: Rabbit soleus muscle. *Biochem. J.* 243, 687-693.
 - 34) Staron, R. S. and Pette, D. (1987): The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibers: Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem. J.* 243, 695-699.
 - 35) Sugiura, T., Matoba, H., Morita, S. and Murakami, N. (1986): Myosin light chain patterns of single fibers and fiber type composition of fast and slow skeletal muscle in rats. *Jpn. J. Phys. Fit. Sports Med.* 35, 248-254.
 - 36) Thomason, D. B., Baldwin, K. M. and Herrick, R. E. (1986): Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 60, 1923-1931.
 - 37) Wagner, D. B. and Weeds, A. G. (1977): Studies on the role of myosin alkali light chains. *J. Mol. Biol.* 109, 455-473.
 - 38) Weeds, A. G. and Hall, G. (1975): Characterization of myosin light chains from histochemically identified fibers of rabbit psoas muscle. *FEBS Lett.* 49, 320-324.