

原 著

骨格筋損傷後の再生単一筋線維におけるミオシン重鎖 アイソフォームの発現*

山田崇史¹⁾ 和田正信²⁾ 中野治郎¹⁾
堤 恵理子¹⁾ 梶原博毅¹⁾

要旨

阻血・圧迫による損傷後のラットヒラメ筋において、ミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; 以下, MHC) アイソフォームの分布を、全筋および単一筋線維において分析した。実験動物には、12週齢のウイスター系雄ラット30匹を用い、左後肢を実験群とし阻血・圧迫を行った。処置後3, 7, 14, 21, 35日に麻酔下でヒラメ筋を摘出し、MHCアイソフォームを電気泳動により分析した。結果、再生過程にあるヒラメ筋では、fast type MHCの割合が増加し、正常なヒラメ筋では認められないMHCIIId, MHCIIbおよびneonatal MHCが出現した。処置後14日目の実験群において、採取した単一筋線維のうち、約60%が2種類以上のMHCアイソフォームを含む混在型筋線維であった。これら混在型筋線維のMHCアイソフォームの組み合わせには様々なものが認められたが、MHCIを含む線維は検出されなかった。一方、処置後35日目の実験群では、fast type MHCに加えMHCIを含む混在型筋線維が確認された。先行研究により、正常な筋において、ミオシンATPase染色でtype IICと同定される線維は、MHCIとMHCIIaを含んでいることが報告されている。本研究の結果から、再生過程にあるヒラメ筋の単一筋線維では、数種類のMHCアイソフォームが発現すること、また、再生筋で出現するtype IIC線維は、MHCアイソフォームの分布に関して正常なものとは異なっていることが示された。

キーワード 再生筋, ミオシン重鎖アイソフォーム, 単一筋線維

緒 言

哺乳類の骨格筋線維には、収縮特性の異なる2種類のタイプが存在し、一方はtype I線維と、もう一方はtype II線維と呼ばれる。両者の間には収縮速度と疲労耐性に特に顕著な違いがみられ、最大収縮速度はtype I線維と比べ、type II線維において2～4倍高い¹⁾。一方、疲労耐性はtype I線維の方が優れており、連続収縮を負荷すると、type II線維では数分間以内で張力が低下するのに対して、type I線維では1時間以上も張力が維持されることが知られている。

2種類の筋線維は、組織化学的にはミオシンATPase (myosin ATPase ; 以下, mATPase) 染色によって類別することができる。この染色法では、type II線維はtype IIA線維とtype IIB線維に細分され、これまでの研究から、type IIB線維と比べtype IIA線維の方が、若干type I線維寄りの収縮特性を有していることが明らかになっている²⁾。

タイプにより筋線維の収縮特性あるいはmATPaseの組織化学的染色反応に差異があるのは、含まれるミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; 以下, MHC) のアイソフォームが異なるためであり、type I線維にはMHCIが、type IIA線維にはMHCIIaが含まれている。一方、type IIB線維には、異なるMHC (MHCIIIdおよびMHCIIb) を含む2種類のものがあり、両者を区別するために、MHCIIIdを含むものはtype IID線維、MHCIIbを含むものはtype IIB線維と呼ばれるようになった (以後、mATPase染色に基づいて類別される筋線維の名称には、h (histochemistry) を付けて、また、含まれるMHCに基づいて同定されるものは、hを付けずに

* Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms in Single Fiber during Regeneration of Rat Soleus Muscle

1) 広島大学医学部保健学科
(〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3)
Takashi Yamada, RPT, Jiro Nakano, RPT, Eriko Tsutsumi, RPT, Hiroki Kajihara, MD: Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

2) 広島大学総合科学部
Masanobu Wada, PhD: Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University
(受付日 2001年6月18日/受理日 2001年11月29日)

表す)。近年の単一筋線維を用いた研究から、type IID 線維と type IIB 線維との間にも、収縮特性に違いがあることが明らかになっている²⁾。全体の1%程度と量的には僅かではあるが、type ICh 線維と呼ばれるタイプも、正常な筋において同定される。これはこれまで述べてきた他のタイプとは異なり1種類のMHCを含むものではなく、MHCIaとMHCIが混在した筋線維である³⁾。

筋が何らかの損傷を受けると、数日後から再生が開始されるが、この過程においてtype ICh 線維の占有率が一時的に増加することが、組織化学的研究から報告されている⁴⁾。筋線維に発現しているMHCのアイソフォームの組成を知ることは、線維の機能を把握するうえでの確かな手法の1つであるが、再生過程にあるtype ICh 線維に含まれるMHCの組成が正常な筋においてみられるものと同じであるかどうかについては不明であること、type IIBh 線維においてはMHCIbとMHCIIdのどちらが含まれているのか判断できないこと、あるいは染色反応が不明瞭な筋線維が多数出現することなどの理由から、mATPase 染色から得られる情報にはおのずと限度がある。さらに、電気泳動法を用い再生筋のMHCについて検討した報告の何れも、全筋を対象にしたものであり⁵⁾、これまで報告された組織化学的・電気泳動的知見から、単一筋線維に含まれるMHCのアイソフォームの種類について、詳細な情報を得ることはできない。

我々理学療法士が治療・訓練を実施するうえで、患者が有する疾病の状態を的確に理解することが重要であることは言うを待たない。再生筋を対象とした理学療法を実施する場合、適切な負荷量を設定するために、筋の機能的変化を推測するための基礎的な資料が不可欠であるが、前述のようにMHCの分布については、必ずしも十分な知見が得られているわけではない。そこで、本研究では、再生過程における骨格筋のミオシンの変化を、細胞レベルで理解することが、効果的な理学療法を行ううえでの一助となるものと考え、筋損傷後の単一筋線維におけるMHCの分布を経時的に検索することを目的とした。

対象と方法

1. 実験動物および実験プロトコル

実験動物には、12週齢のウイスター系雄性ラット30匹を用いた。ラットを麻酔(ネブタール、50 mg/kg)した後、左後肢をゴムベルト(長さ120×幅18×厚さ1 mm)でらせん状に強く巻き、足部から大腿部までの阻血と圧迫を行った。4時間の圧迫処置後、ラットをケージに戻し、以後通常飼育を行った。なお、水および食餌は自由摂取とした。圧迫時間を4時間としたのは、予備実験において、4時間以上の処置を施すことによって、対象とするヒラメ筋のほぼ全域に同程度の損傷を起こす

ことができることが観察されたためである。処置直後、圧迫が施された左後肢では、完全な運動麻痺が認められたが、時間経過とともに徐々に回復し、処置後3週では後肢の各関節ともほぼ正常な動きを取り戻した。

処置を施した左後肢を実験群(以下、E群)と、また無処置の右後肢を対照群(以下、C群)とした。処置後3日(C3群、E3群)、7日(C7群、E7群)、14日(C14群、E14群)、21日(C21群、E21群)、35日(C35群、E35群)に、各6匹ずつ麻酔下にてヒラメ筋を摘出し、直ちに筋湿重量を測定した。各々の筋を2つに分け、一方を組織学的分析に、もう一方を生化学的分析に用いた。

2. 組織学的分析

液体窒素で冷却したイソペンタン中で筋を瞬間凍結した後、10 μm厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびmATPase 染色を施した。mATPase 染色における前処理のpHは10.5と4.3の2種類、前処理の時間はpH 10.5では15分間、pH 4.3では10分間であった。前処理終了後、3.1 mM ATPを含む溶液(pH 9.4)中で30分間反応させた。なお、前処理および反応溶液のバッファーには、0.1 M 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノールを用いた⁶⁾。

3. 生化学的分析

1) 筋タンパクの抽出

全筋におけるMHCアイソフォームを分析するために、筋組織約10~20 mgを40倍(w/v)の抽出液(5 M 尿素、2 M チオ尿素、0.017% (v/v) β-メルカプトエタノール、10 mM ピロリン酸ナトリウム)でホモジネートし、分析まで-70℃で保存した。処置後14、21、35日の筋については、単一筋線維に含まれるMHCアイソフォームの分析を行った。採取した筋の一部を、-70℃で約24時間凍結乾燥(タイテック社製、VD-16)した後、実体顕微鏡下でピンセットを用いて単一筋線維を採取した。マイクロホモジナイザー中で、30 μlの抽出液でホモジネートし、分析まで-70℃で保存した。ヘマトキシリン・エオジン染色の結果、同一群内では筋間に損傷程度の差異がほとんど認められなかったことから、単一筋線維は、各群において無作為に選んだサンプルからできるだけ多く採取した。

2) 電気泳動

MHCアイソフォームの分離には、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; 以下、SDS-PAGE)を用いた⁷⁾。分離ゲルの組成は、6.8% (w/v) アクリルアミド、0.18% (w/v) ビスアクリルアミド、0.2 M トリス/0.1 M グリシン(pH 8.6)、

30% (v/v) グリセロール, 0.4% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.05% (w/v) 過硫酸アンモニウムであった。通電は, 4℃の条件下で120Vの定電圧で約48時間継続した。泳動終了後, Oakleyら⁸⁾の方法に従い銀染色を行った。全筋におけるMHCアイソフォームについては, 染色結果をスキャナーでコンピューターに取り込み, 画像解析ソフト (NIH-image) を用いてバンドの量比を算出した。

4. 統計学的処理

統計量は平均±標準偏差で示した。C群とE群間の比較には, pairedのt検定を用いた。なお, 有意水準は5%未満とした。

結 果

1. ヒラメ筋における筋湿重量

筋湿重量の測定結果を図1に示した。C群では処置後ほぼ一定であったのに対して, E群では処置後21日目まで漸次減少することが認められ, C14群とE14群間, C21群とE21群間およびC35群とE35群間の差異は統計的に有意であった。E21群の絶対値は 42.7 ± 15.2 mgであり, これはC21群の35.7%の値であった。E35群ではE21群よりも高値を示したが, C35群の70%程度であった。

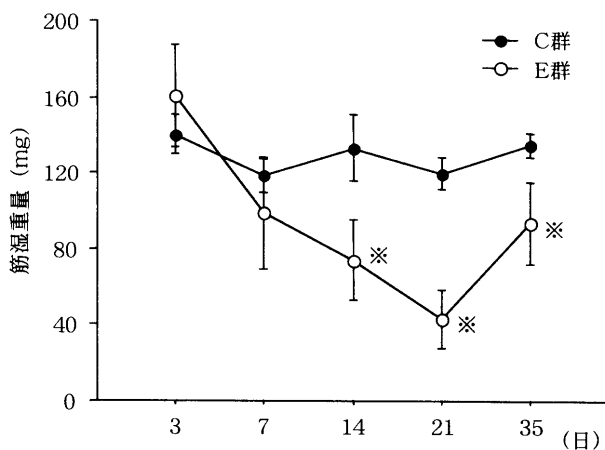


図1 ヒラメ筋における筋湿重量の変化

*; 対照群との有意差。有意水準はすべて5%未満とした。

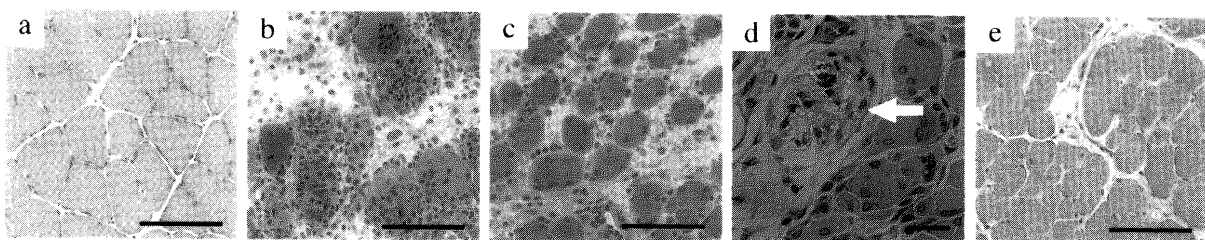


図2 ヘマトキシリン・エオジン染色

C群 (a)。E3群では, 多数の炎症細胞が浸潤し, ほとんどの筋線維が壊死していた (b)。E7群では, 細胞の中心部に核を持つ再生筋線維が多く認められ (c), 有髄神経においてシュワン細胞や軸索の変性 (矢印) が確認された (d)。E35群においては, 細胞の辺縁に核が移動しているものが認められた (e)。Bar = 100 μ m

2. 組織学的分析

1) ヘマトキシリン・エオジン染色

図2に, C群, E3群, E7群およびE35群におけるヘマトキシリン・エオジン染色の典型的な結果を示した。E3群では筋線維の解離や間質の拡張がみられ, 好中球やマクロファージを含む多数の浸潤細胞が筋線維の内外において確認された (図2-b)。また, 縦断切片からは, これら浸潤細胞が1本の筋線維のほとんどの部分において存在することが確認された (結果は示されていない)。E7群では, 好塩基性の胞体を持ちかつ細胞の中心部に核を持つ再生筋線維が多くみられるようになった (図2-c)。一方, 部分的に細胞内器官が残存していると考えられる変性筋線維も少数観察された。また, E7群およびE14群では, 有髄神経においてシュワン細胞や軸索の変性が認められた (図2-d)。E35群では, 細胞質はやや成熟し, 細胞の辺縁に核が移動しているものが認められたが, 細胞質は対照群に比べ小さいままであった (図2-e)。

2) mATPase 染色

各群におけるmATPaseの典型的な染色結果を図3に示した。C群ではpH 4.3で活性を保つ線維が多くみられ, またそれら染色強度はほぼ一様であった (図3-a)。C群と比較するとE3群では染色パターンは劇的に変化し, pH 10.5でもpH 4.3でも染色されない線維がほとんどであった (図3-b, h)。E7群およびE14群では少数の筋線維がpH 4.3で淡染していること, またpH 10.5では全ての再生筋線維が淡染していることが観察された。E7群あるいはE14群と比較すると, E21群ではpH 4.3の染色性に変化がみられ, 淡染する筋線維が束になって幾つかの部位に出現した (図3-e)。E35群ではpH 4.3で染色性を示す線維が増加したが, C群とは異なりそれらの染色強度にはかなりの差異がみられた。一方, pH 10.5では全ての筋線維が染色性を示したが, pH 4.3での染色強度が強いものほど淡染する傾向が認められた (図3-l)。

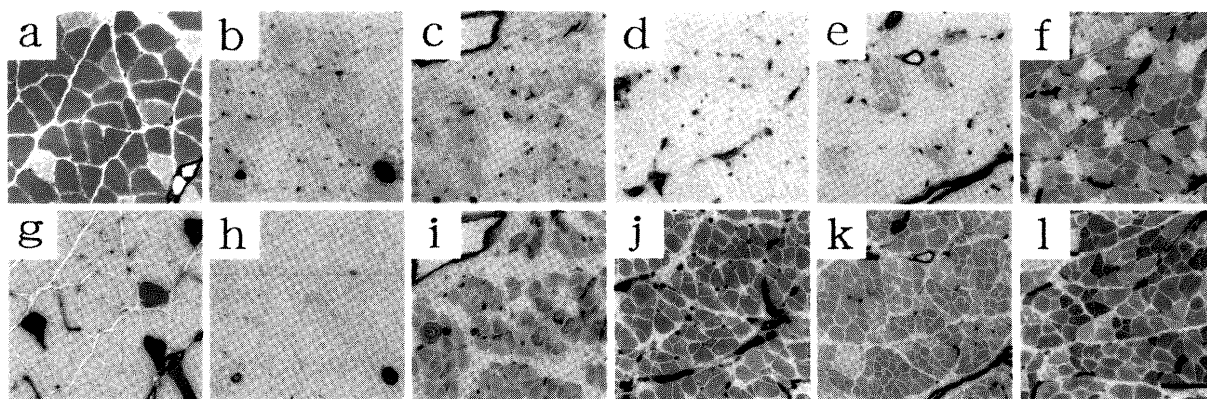


図3 ミオシン ATPase 染色

C群 (a, g), E3群 (b, h), E7群 (c, i), E14群 (d, j), E21群 (e, k), E35群 (f, l) におけるミオシン ATPase 染色の結果。a, b, c, d, e, fは前処理 pH 4.3, g, h, i, j, k, lは前処理 pH 10.5で行った。E7群あるいはE14群と比較すると、E21群では pH 4.3の染色性に変化がみられ、淡染する筋線維が束になって幾つかの部位に出現した (e)。E35群では、pH 4.3と pH 10.5の両方で前処理で染色される線維が、モザイク状の分布を呈していた。また、様々な染色強度の筋線維が存在した (f, l)。Bar = 50 μ m

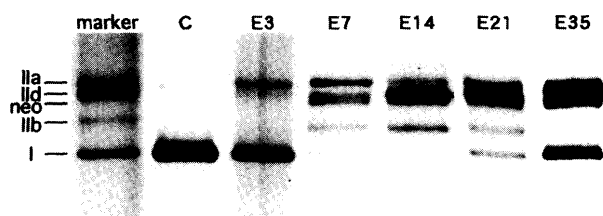


図4 全筋におけるミオシン重鎖アイソフォームの泳動パターン
C群では、MHCIおよびMHCIIaの2種類が確認された。E3群では、MHCIIIdおよびMHCIIbがわずかに検出された。E7群およびE14群ではMHCIのバンドの染色性が著明に低下し、一方で、fast type MHC (MHCIIa, MHCIIId, MHCIIb) が鮮明に確認された。さらに、E7群、E14群およびE21群では幼若型 MHC (neonatal MHC) の発現も観察された (MHCIIIdの下)。E35群ではMHCIのバンドが鮮明に確認されたが、MHCIIbおよびMHCIIIdが依然として認められた。Marker: 横隔膜および足底筋の混合。

3. ミオシン重鎖のアイソフォームの分布

1) 全筋

全筋における MHC アイソフォームの典型的な泳動パターンを図4に、その構成比を図5に示した。C群では MHCI および MHCIIa の2種類のアイソフォームが検出され、各群 (C3群, C7群, C14群, C21群および C35群) 間において、この2つの分布に顕著な差異は認められなかった。処置後14日までMHCIは漸減し、E14群ではその分布比率は $3.6 \pm 2.2\%$ であった。これとともに正常なヒラメ筋では存在しないMHCIIIdやMHCIIbが出現し、その占有率は徐々に増加した。さらに、E7群、E14群およびE21群では幼若型 MHC (neonatal MHC) の発現も観察された。E21群からMHCIの増加が始まり、E35群では $28.1 \pm 4.8\%$ がこのアイソフォームで占められていた。処置後21日目以降MHCIIIdおよびMHCIIbの割合は減少したが、E35群においても依然としてそれらの存在が認められた。

2) 単一筋線維

単一筋線維における MHC アイソフォームの典型的な泳動パターンを図6に、各群における MHC の組合せの分布を図7に示した。C群では、MHCIのみを含む筋線維が殆どであった。2つ以上の MHC アイソフォームを含む、いわゆる混在型線維は分析した筋線維の7.7%であり、それらは何れもMHCIとMHCIIaを発現していた。一方、E群では採取した筋線維の殆どが混在型筋線維であったが、混在のパターンはC群のものとは異なっていた。E14群の混在型筋線維は、fast type MHCのみを含んでおり、fast type と slow type が混在した筋線維は検出されなかった。E21群では、E14群でみられたものに加え、fast type 2種類にslow typeであるMHCIを含むものが観察された。またE35群では、MHCIを含む混在型線維が増加し、少数ではあったが、4種類全てのアイソフォームを含む線維も存在した。

考 察

正常な骨格筋線維の基底膜と形質膜の間に存在する衛星細胞は、静止期にある筋芽細胞であり、既存の筋線維が何らかの損傷を受けた場合、それらを修復したり、あるいは新たな線維を再生したりする機能を担っている。本研究では、処置後7日目に細胞の中心部に核を持つ再生筋線維が多く確認されたが (図2-c)、これらは衛星細胞が分裂・増殖し、互いに融合した結果形成されたものであると考えられる。

90%以上が type II 線維から構成される前脛骨筋から採取した衛星細胞を *in vitro* で培養すると、これらが fast type MHC アイソフォームを発現することを示す Dusterhoft と Pette⁹⁾ の報告からは、筋芽細胞が発現する MHC の種類はある程度遺伝的にプログラミングされていることが示唆される。これに対して、*in vivo* にお

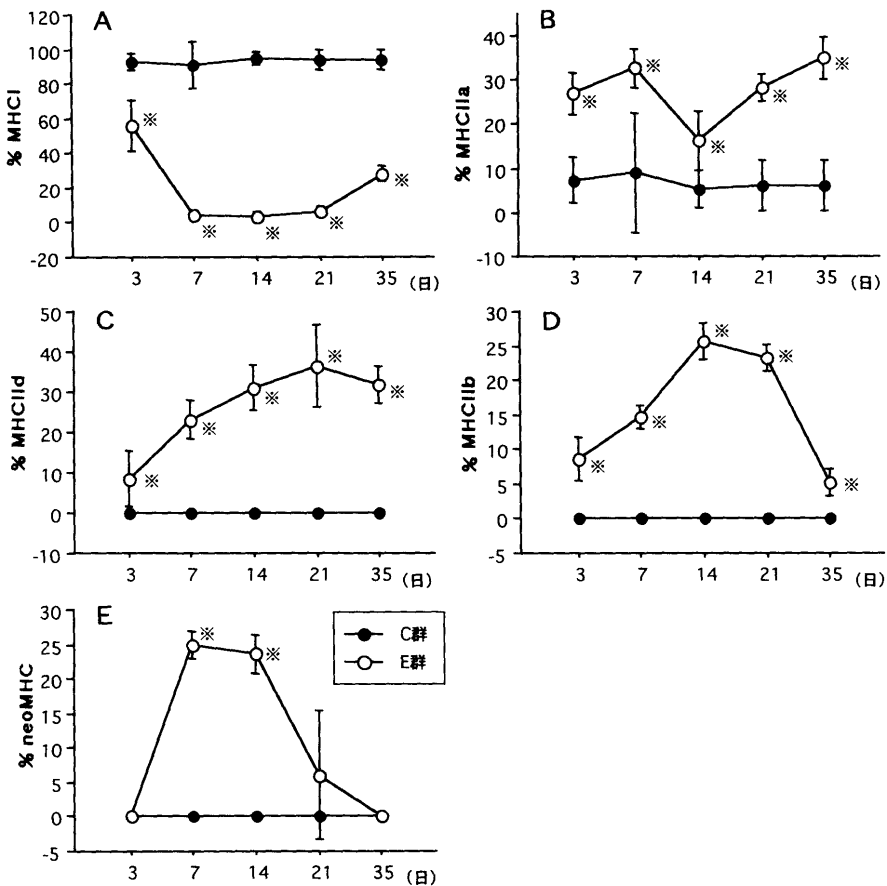


図5 全筋におけるミオシン重鎖アイソフォームの構成比の変化

A: MHCI, B: MHCIIa, C: MHCIIc, D: MHCIIb, E: neoMHC. ※; 対照群との有意差. 有意水準はすべて5%未満とした。

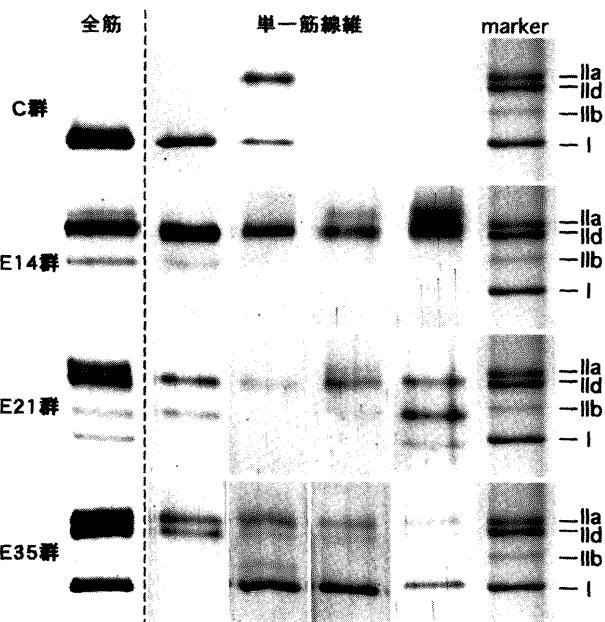


図6 単一筋線維におけるミオシン重鎖アイソフォームの泳動パターン

最も左側のレーンは全筋における泳動パターンを, それ以外は単一筋線維における泳動パターンを示す。Marker: 横隔膜および足底筋の混合。

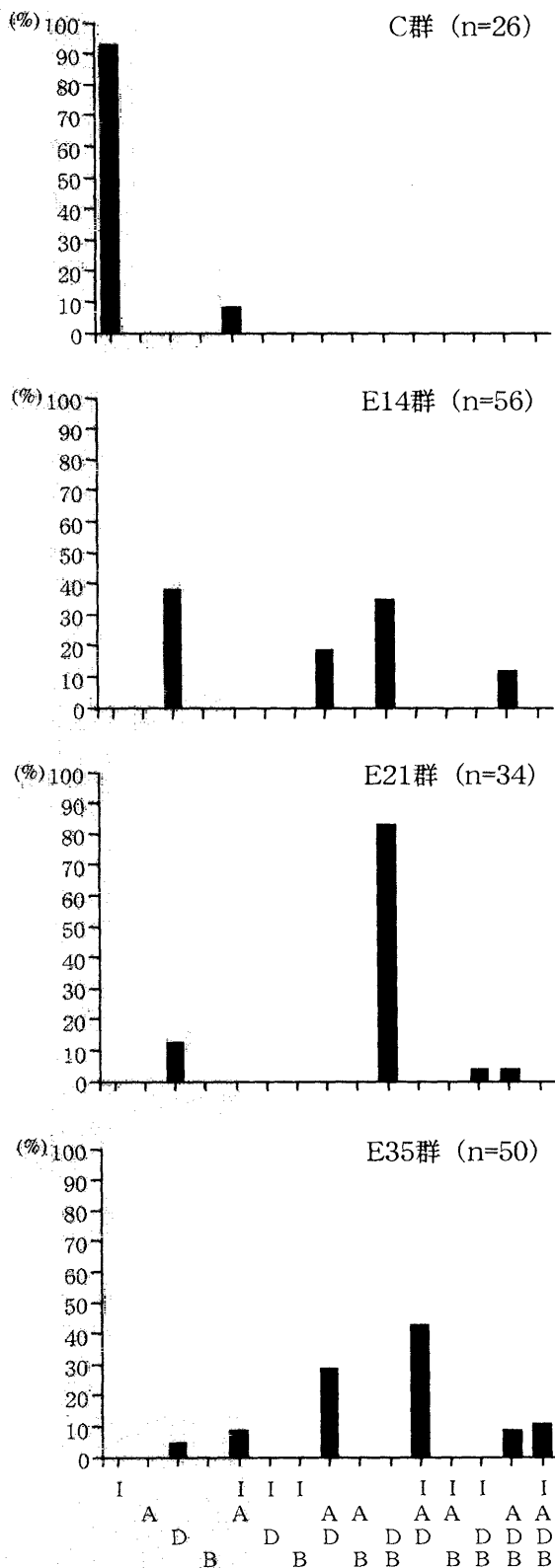


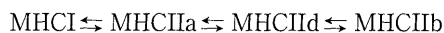
図7 単一筋線維におけるミオシン重鎖アイソフォームの分布
横軸は単一筋線維のMHCアイソフォームの組み合わせを、縦軸は出現頻度を示す。

けるMHCの発現は、神経支配^{10) 11)}、甲状腺ホルモンの濃度¹²⁾あるいは運動負荷¹³⁾など、多くの外的シグナルによって変化することが明らかになっている。したがって、再生過程にある細胞でのMHCアイソフォームの発現には、衛星細胞の特質と細胞を取り巻く環境の両方が影響するものと思われる。

図5に示されるように、処置後14日目では、再生筋線維が存在していたにも関わらず、MHCIの占有率は3.6%であり、C群の94.7%と比べると顕著な減少がみられた。ヒラメ筋の筋線維は、神経支配を受けないとfast type MHCを、一方持続性のインパルスを発する運動神経細胞の支配を受けるとslow type MHCを多く発現する傾向にあるとされている^{10) 11)}。末梢神経の変性がこの時期に認められており、再生筋線維が神経支配を受けないことが、このような結果を招来したものと推察される。単一筋線維の分析結果は全筋のものとは一致し、全ての線維がfast type MHC (MHCIIa, MHCIIId, MHCIIb) で構成されていた。しかしながら、MHCIを含む単一筋線維は検出されず、全筋の分析で僅かに検出されたMHCIは、新たに合成されたものというより、一部の筋線維において残存したものであるのかもしれない。

処置後14日目と比較すると、21日目では組織化学的特性、生化学的特性の両方で、明らかに異なる結果が観察された。組織化学的には、mATPase染色において同様の染色性を示す線維が群をなして出現する、いわゆる筋線維タイプ群化が認められたことである(図3-e)。タイプ群化は再神経支配が進行している時に生ずる現象であり¹⁴⁾、処置後14日目以降から再神経支配が開始された可能性が高い。MHCIを含む単一筋線維が検出されるようになったこと(図6)、および全筋においてMHCIが増加し始めたこと(図5)を示す生化学的結果は、これを裏づけるものである。

何らかの要因によりMHCアイソフォームの分布が変化する場合、



の順で変化することが知られている¹⁵⁾。その際、2種類のMHCアイソフォームを含む混在型筋線維が通常より多く出現するが、上記の順序性のため、その組合せは、MHCI-MHCIIa, MHCIIa-MHCIIId, MHCIIId-MHCIIbの何れかである。一方、本研究における単一筋線維の分析は、3種類以上のアイソフォームを含む線維が存在すること、また、その組合せにはMHCI, MHCIIIdとMHCIIbなど、上述の順序性から逸脱したものが存在することを示した。正常な筋と再生筋とでこの様な違いがあるのは、再生過程におけるMHCアイソフォームの変化のメカニズムが、壊死-再生を起こさない場合とは根本的に異なっているからであろう。

正常の筋における type IICH 線維は、MHCI と MHCIIa の 2 種類のアイソフォームを含んでおり、mATPase 染色において、アルカリ、酸何れの前処理でも活性を失わない特性を持っている³⁾。組織化学的に分類されるこの線維は、正常な筋では少数しか存在しないが、再生過程で多く出現することが認められており⁴⁾、本研究においても処置後 35 日目に多数みられた (図 3-f, l)。一方、正常なヒラメ筋では存在しない MHCIIc や MHCIIb が発現していること、また、単一筋線維の分析からは、これらのアイソフォーム (MHCIIb, MHCIIc) は、MHCI や MHCIIa と混在していることが確認された。これらの知見からは、再生筋において組織化学的に type IICH と同定される線維は、正常な筋にみられるものとは、MHC の組成が異なっていることが示唆される。

Staron と Pette¹⁶⁾ は、ラビットのヒラメ筋において、mATPase 染色の染色性と MHC アイソフォームとの関連を詳細に検討した。その結果、mATPase 染色の染色強度は含まれる fast と slow type の MHC の割合に依存し、slow type が多いものほど、pH 4.3 で濃染することを示した。処置後 35 日目で、mATPase 染色の染色強度がバラエティに富んでいた事実は (図 3-f, l)、含まれる fast と slow type MHC の割合が筋線維間で著しく異なっていることを明示するものである。

前述のように本研究では、再生筋に出現する type IIC 線維は、正常な筋におけるものとは MHC の組成が異なることが示され、この知見からは、これら 2 つの筋線維間においては、収縮速度および疲労耐性が、大きく異なっていることが推察される。単一筋線維を対象として得られた本研究の結果は、組織化学的に type IICH 線維と類別される筋線維を多く含む筋に理学療法を施す際、対象により処置内容を十分に検討する必要性があることを示唆するものである。

文 献

- 1) Reiser PJ, Kasper CE, *et al.*: Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am J Physiol* 254: C605-C613, 1988.
- 2) Galler S, Schmitt TL, *et al.*: Stretch activation, unloaded shortening velocity, and myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle fibers. *J Physiol* 478: 513-521, 1994.
- 3) Aigner S, Gohlsch B, *et al.*: Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IIc, not IIb predominates. *Eur J Biochem* 211: 367-372, 1993.
- 4) 壺中征哉: 臨床のための筋病理. 第 2 版, 日本医事新報社, 東京, 1993, pp 36-39.
- 5) Marechal G, Schwartz K, *et al.*: Isozymes of myosin in growing and regenerating rat muscles. *Eur J Biochem* 138: 421-428, 1984.
- 6) Gollnick PD, Parsons D, *et al.*: Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry* 77: 543-555, 1983.
- 7) Wada M, Okumoto T, *et al.*: Expression of hybrid isomyosins in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 271: C1250-C1255, 1996.
- 8) Oakley BR, Kirsch DR, *et al.*: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 361-363, 1980.
- 9) Dusterhoft S, Pette D: Satellite cells from slow rat muscle express slow myosin under appropriate culture conditions. *Differentiation* 53: 25-33, 1993.
- 10) Snoj-Cvetko E, Sketelj J, *et al.*: Regenerated rat fast muscle transplanted to the slow muscle bed and innervated by the slow nerve, exhibits an identical myosin heavy chain repertoire to that of the slow muscle. *Histochem Cell Biol* 106: 473-479, 1996.
- 11) Snoj-Cvetko E, Smerdu V: Adaptive range of myosin heavy chain expression in regenerating soleus is broader than in mature muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 17: 401-409, 1996.
- 12) Devor ST, White TP: Myosin heavy chain of immature soleus muscle grafts adapts to hyperthyroidism more than to physical activity. *J Appl Physiol* 80: 789-794, 1996.
- 13) Bigard AX, Janmot C, *et al.*: Changes in myosin heavy chain profile of mature regenerated muscle with endurance training in rat. *Acta Physiol Scand* 165: 185-192, 1999.
- 14) Bodine-Fowler SC, Unguez GA: Innervation patterns in the cat tibialis anterior six months after self-reinnervation. *Muscle Nerve* 16: 379-391, 1993.
- 15) Pette D, Vrbova G: Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 120: 116-202, 1992.
- 16) Staron RS, Pette D: Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86: 19-23, 1986.

〈Abstract〉

**Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms in Single Fiber
during Regeneration of Rat Soleus Muscle**

Takashi YAMADA, RPT, Jiro NAKANO, RPT, Eriko TSUTSUMI, RPT,
Hiroki KAJIHARA, MD

Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University

Masanobu WADA, PhD

Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

Regeneration of rat soleus muscles was examined after injury had been achieved by the rubber band compression on the left hindlimb. Changes in the distributions of myosin heavy chain (MHC) isoforms in single fibers as well as in whole muscles were electrophoretically followed for 3 to 35 days after injury. Regeneration evoked not only a pronounced increase in the relative protein concentration of fast type MHC isoforms, but also an appearance of MHCII_d, MHCII_b and neonatal MHC isoforms that are not comprised in normal soleus muscles. A single fiber analysis showed an elevation in the normally rare hybrid fiber population 14 days after injury (i.e., fibers containing more than one MHC isoform). At that time, hybrid fibers amounted to almost 60% of the total fibers studied. The combinations of MHC isoforms in hybrid fibers varied, but none of them expressed slow type MHCI. On the other hand an appreciable number of single fibers contained MHCI with various fast type MHC isoforms after 35 days. Previous studies demonstrated that, in normal muscles, type IIC fibers classified on the basis of a histochemical staining for myofibrillar actomyosin ATPase consisted of MHCI and MHCII_a in varying ratio. The results presented in this study suggest that type IIC fibers during regeneration may differ from those in normal muscles with regard to the distribution of MHC isoforms.