

骨格筋のミオシン分子種組成および加齢にともなうその分布変化*

土路 恭子

広島大学大学院生物圏科学研究科

Distribution of myosin isoforms in skeletal muscles and its change with age

Kyoko TORO

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739, Japan*

要 旨

骨格筋線維はその収縮速度により、遅筋線維と速筋線維とに大別され、さらに速筋線維は、type IIa、type IIc、type IIb 線維のサブタイプに細分される。そして、それぞれに単一のミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) 分子種が含まれている。近年、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; SDS-PAGE) で MyHC 分子種を分離する際、MyHCIIb よりもわずかに移動度の大きな 200kDa タンパク (MyHCIIb') が発見された。そして、筋の活動量が増大すると、MyHC 全体に占めるこのタンパクの割合が増大すると報告されているが、どのような特徴をもつのかは不明である。また、異なるさまざまな骨格筋における分布状況も、加齢にともないどのような発現パターンを示すのかはわかっていない。これらを識ることは、筋収縮のしくみを解明していくことのみならず、筋の張力発揮における多様性およびその加齢変化についても何らかの影響を及ぼすものと考えられる。そこで本研究では、ラット骨格筋を用い、このタンパクについての詳細な特徴や異なる骨格筋における分布状況を調べ、加齢にともなう発現パターンを明らかにすることを目的とした。

1. MyHC 分子種間の分離に関する電気泳動法の改良

まず、MyHC 分子種分離に適した分離ゲルについて検討した。MyHC 分子種に関する多くの先行研究では、SDS-PAGE による分離の再現性が低い。その原因として、分離ゲル中のグリセロールおよびアクリルアミドの各濃度が不適切であったことと、分離ゲルに濃度勾配をつけているため、分子量のちがいがわずかである MyHC 分子種の分離が確実にはなされなかったものと思われる。そこで、MyHC 分子種の分離について、より再現性の高い泳動方法を分離ゲルに着目して検討を行った。12週齢ラットを用い、すべての MyHC 分子種が含まれている足底筋について SDS-PAGE による分析を行った。その結果、分離ゲルに 5-8% の勾配をつけたときよりも 7% 均一のほうが

広島大学総合科学部紀要Ⅳ理系編、第23巻 (1997)

*広島大学審査学位論文

口頭発表日：1997年2月12日、学位取得日 1997年3月25日

各分子種の泳動度の違いが大きかった。また、グリセロール濃度は37.5%よりも30%の方がより適していた。さらに、トリスバッファのpHは8.6-8.8の間が適していた。これらの条件設定によって、既知の4つの成熟骨格筋MyHC分子種を分離することができた。

2. 異なる骨格筋におけるミオシン重鎖分子種の分布

つぎに、上述の分離ゲル条件を用いてロングゲルを作製し、Wada et al. (1992)の報告したMyHCIIb'を完全に分離した。その抗原性を調べた結果、速筋型MyHC分子種の一つであることが示された。SDS-PAGEによってMyHCIIID/Xの次に検出されたMyHC分子種であることからMyHCIIeと名付けた。MyHCIIeの分布をさまざまな骨格筋において調べたところ、足底筋、長指伸筋、肛門挙筋、腓腹筋外側頭表層部および深層部、外側広筋表層部および深層部においてMyHCIIeの発現が認められ、MyHC分子種全体に占める割合は肛門挙筋で最も多く(23.4%)、腓腹筋外側頭深層部で最も少なかった(3.7%)。このことは先行研究において免疫組織化学的にMyHC分子種が新たに検出されただけでなく、また、これまでMyHCIIbとされてきたMyHCIIb + MyHCIIeに占めるMyHCIIeの割合が、Sawchak et al. (1992)の報告している新たな分子種と同一のものであるかどうかを検討した。外側広筋深層部および表層部、腓腹筋外側頭深層部および表層部、長指伸筋、肛門挙筋、足底筋、ヒラメ筋、横隔膜をSDS-PAGEに供し、得られた泳動パターンをデンストメーターで定量化し、MyHC組成を比較した。

実験から、以下の結果が得られた。

- (1) MyHCIIeが抗速筋型ミオシン抗体に対する反応を示した。
- (2) Sawchak et al. (1992)の発見したMyHC分子種を含んでいる筋だけでなく、ヒラメ筋以外の被検筋すべてにMyHCIIeが検出された。
- (3) MyHCIIe/MyHCIIb比は筋間で必ずしも同様ではなかった。

これらのことから、MyHCIIeは速筋型MyHCと共通のエピトープをもち、Sawchak et al. (1992)のものとは別のMyHC分子種である可能性が示された。また、ヒラメ筋ではMyHCIIeが検出されなかったことから、少なくとも200kDaを超える分子量をもつタンパクの分解産物ではない。したがって、MyHCIIeは新たなMyHC分子種であると考えられる。

3. 加齢にともなう骨格筋ミオシン分子種の発現パターン

外側広筋表層部のMyHCはそのほとんどがMyHCIIbであり、このほかに数%のMyHCIIID/Xを含む。長指伸筋や前脛骨筋では、加齢にともない、MyHCIIbからMyHCIIID/Xへと移行することがわかっているが、このMyHCIIbにはMyHCIIeも含まれているため、MyHCIIeが加齢にともなって移行するのかどうかは不明のままである。そこで、MyHCIIeに焦点を当て、加齢にともなうMyHCの発現パターンを調べた。また、ミオシン軽鎖(myosin light chain; MyLC)分子種についても検討を加えた。

3、12、18ヶ月齢雄ラットの外側広筋表層部、ヒラメ筋、咬筋表層部をMyHCおよびMyLCについて、SDS-PAGE(MyHC用)および等電点電気泳動法とSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動法(MyLC用)により分析した。また、生体内でMyHCと実際に結合しているMyLCの各分子種について、ピロリン酸電気泳動法で分析した。その結果、

- (1) ヒラメ筋では、先行研究と同様、加齢にともないMyHCIIaの減少、MyHCIの増加が傾向としてみられた。
- (2) 外側広筋表層部では、MyHCIIbが減少、MyHCIIeが増加したが、MyHCIIID/Xは変わ

らなかった。

- (3) 咬筋表層部では、MyHCIID/Xが減少、MyHCIIEが増加し、MyHCIIBは変わらなかった。
- (4) ヒラメ筋のMyLC分子種の発現はMyLC2fからMyLC2sへと切り替わったが、外側広筋表層部および咬筋表層部ではMyLC分子種組成は変わらなかった。
- (5) 生体内でMyHCと実際に結合しているMyLCは、MyLC3fだけを結合しているMyHCが減少し、MyLC3fとMyLC1fの両方を結合しているMyHCが増加した。

これらのことから、本研究で用いたラットの加齢変化は先行研究とほぼ同様であり、そのなかで、外側広筋表層部ではMyHCIIBからMyHCIIEへの、咬筋表層部ではMyHCIID/XからMyHCIIEへの移行が推察された。また、加齢にともないMyLC発現そのものは変化しないものの、MyHCに対するMyLC3fの親和性が低下することが示された。

4. 結 論

第4の速筋型分子種MyHCIIEは骨格筋に広く分布し、加齢にともなうMyHC分子種発現の移行順序ではMyHCIID/XとMyHCIIBの中間に位置付く可能性がある。また、加齢にともないMyHCの分子種発現が変化することで、遊離したMyLCが増加する可能性がある。