

異なる骨格筋における同一タイプの単一筋線維代謝特性と構造特性の相互関係

竹倉 宏明\*, 吉岡 利忠\*\*

## Relationship between Metabolic and Ultrastructural Profiles in Single Muscle Fibre of Different Types in various Muscles

Hiroaki TAKEKURA\* and Toshitada YOSHIOKA\*\*

### Abstract

The relationship between metabolic and ultrastructural profiles in single muscle fibre of different types (slow-twitch oxidative: SO, fast-twitch oxidative glycolytic: FOG, and fast-twitch glycolytic: FG fibre) were studied in various (tibialis anterior: TA, extensor digitorum longus: EDL, gastrocnemius: GC, and soleus: SOL) muscles employing biochemical and electron microscopical techniques. Male Wistar strain rats (15-week-old, n=30) were used in the present study. Single muscle fibres were dissected from TA, EDL, GC, and SOL muscles, and typed histochemically into SO, FOG, and FG fibres. The remaining parts of the single muscle fibre used for the classification of fibre type were used for biochemical (phosphofructokinase: PFK and succinate dehydrogenase: SDH activity) as well as for electron microscopical (mitochondrial volume) analysed. PFK activity in FG fibre was highest in EDL, less in TA and lowest in GC muscles, with a significant difference ( $p < 0.01$ ) between EDL and GC muscles, and TA and GC muscles. SDH activity in SO fibre decreased in the order of SOL, GC, TA, and EDL muscles with a significant difference ( $p < 0.01$ ) between SOL and other muscles. Glycolytic enzymes (PFK) activity was higher in fast-twitch, especially FG fibre in extensor (TA and EDL) muscles, on the other hand, oxidative enzyme (SDH) activity was higher in slow-twitch (SO) fibre in flexor (GC and SOL) muscles. No significant difference was observed in the mitochondrial volume in all types of fibre compared with four kind of muscles.

These results suggested that the oxidative capacity in skeletal muscle fibre did not always depend on the mitochondrial volume. Moreover, these results indirectly support the opinion that metabolic and ultrastructural profiles of the skeletal muscle fibre were acquired by their contractile characterization.

**KEY WORDS:** *Single muscle fibre, fibre type, metabolic profile, mitochondria*

---

\* National Institute of Fitness and Sports, Kanoya, Kagoshima 891-23, Japan

\*\* St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa 213, Japan

## 緒 言

骨に付着し、関節を可動させることにより運動を発現させる骨格筋は、actomyosin ATPaseの酸に対する安定性<sup>4)</sup>及び、actomyosin ATPase活性値と酸化系酵素活性値の高低の組合せ<sup>13)</sup>といった組織化学的染色法により、3ないし4種類に分類される<sup>3)</sup>筋線維の集合体である。一般的に、actomyosin ATPase活性値が骨格筋線維の収縮速度と比例的な関係を有する<sup>2)</sup>ことから、組織化学的染色結果は骨格筋線維の機能的特性を反映すると考えられている。さらに、収縮速度が速い筋線維

はその収縮エネルギー獲得反応を主に解糖系に依存し、収縮速度が遅い筋線維は主に酸化系に依存することも報告されており<sup>10),16)</sup>、生理学的特性と生化学的的特性の間にも密接な関係を有すると考えられる。しかし、組織化学的染色により同一タイプと判定された筋線維の代謝及び構造特性が、いかなる種類の骨格筋においても同一であるかは明らかではない。そこで本研究ではWistar系ラットを対象として、種類の異なる下肢骨格筋より摘出した同一タイプの単一筋線維の代謝並びに構造特性を検討することを目的とした。

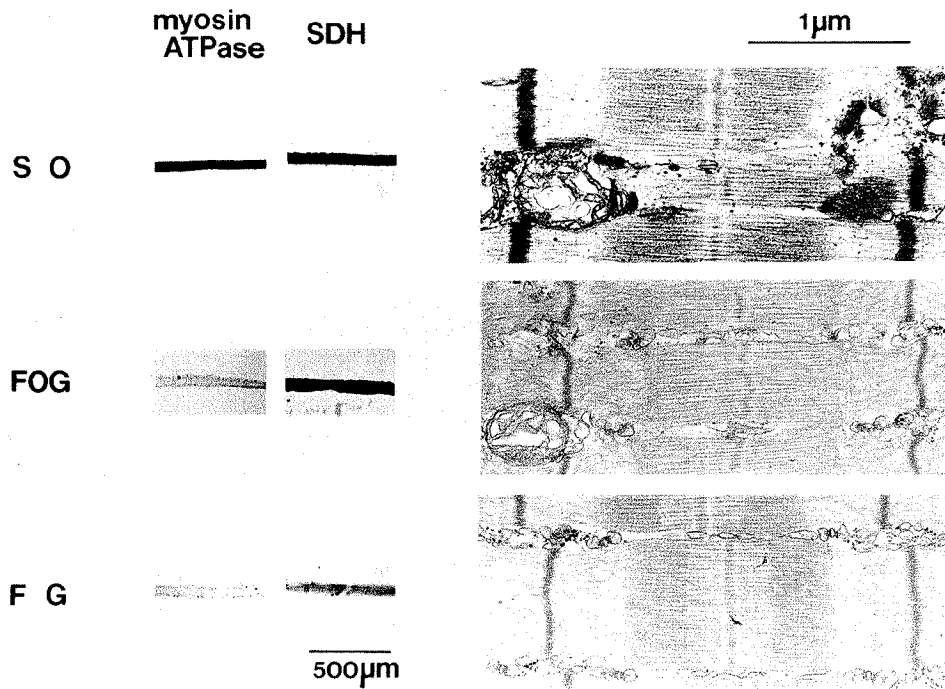


Figure 1. Light and electron micrographs of each type of single muscle fibres classified by actomyosin ATPase (pre-incubation pH 4.35) and succinate dehydrogenase (SDH) stainings. All types of single muscle fibres were dissected from extensor digitorum longus (EDL) muscle. Abbreviations; SO: slow-twitch oxidative fibre, FOG: fast-twitch oxidative glycolytic fibre, FG: fast-twitch glycolytic fibre.

\* 鹿屋体育大学体力科学講座

Department of Physiology and Biomechanics, National Institute of Fitness and Sports, Shiromizu, Kanoya, Kagoshima 891-23, Japan

\*\* 聖マリアンナ医科大学生理学教室

Department of Physiology, St. Marianna University School of Medicine, Miyamae, Kawasaki, Kanagawa 213, Japan

## 方 法

### 1. 単一筋線維の分離及び筋線維タイプの決定

実験動物には生後15週齢の Wistar 系雄性ラット 30匹を用いた。Sodium pentobarbital 麻醉下(45mg/kg body weight, i.p.)にて両下肢より前頸骨筋 (TA), 長指伸筋 (EDL), 腓腹筋 (GC), ヒラメ筋 (SOL) を摘出し, 左下肢の筋により単一筋線維の分析を行い, 右下肢の筋により全筋の組織化学的分析を行った。温血動物用 relaxing

solution (120 mM:KCl, 4mM: ATP, 0.5 mM: EGTA, 10mM: PIPES, 10mM: MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8) 中にて単一筋線維を分離した。得られた単一筋線維を3等分し, 1本を長軸方向に引き裂き筋膜部が下になるようにそれぞれをカバーグラスに添付した。それぞれの試料に actomyosin ATPase 染色 (pre-incubation pH 4.35, 10.4)<sup>7)</sup>, 及び succinate dehydrogenase (SDH) 染色<sup>11)</sup>を施した。得られた標本から各単一筋線維を Peter et al.<sup>13)</sup>の分類に基づき slow-twitch oxidative (SO),

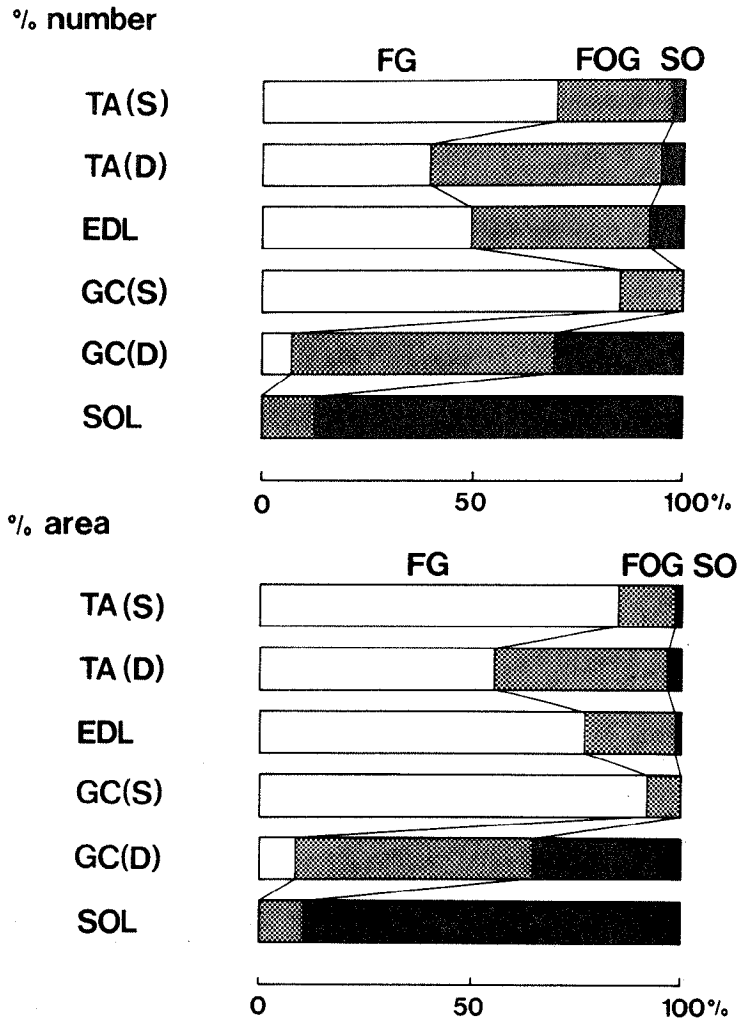


Figure 2. Muscle fibre type composition (% number and % area) in various muscles. Abbreviations; TA: tibialis anterior, EDL: extensor digitorum longus, GC: gastrocnemius, SOL: soleus, (S): superficial portion, (D): deep portion.

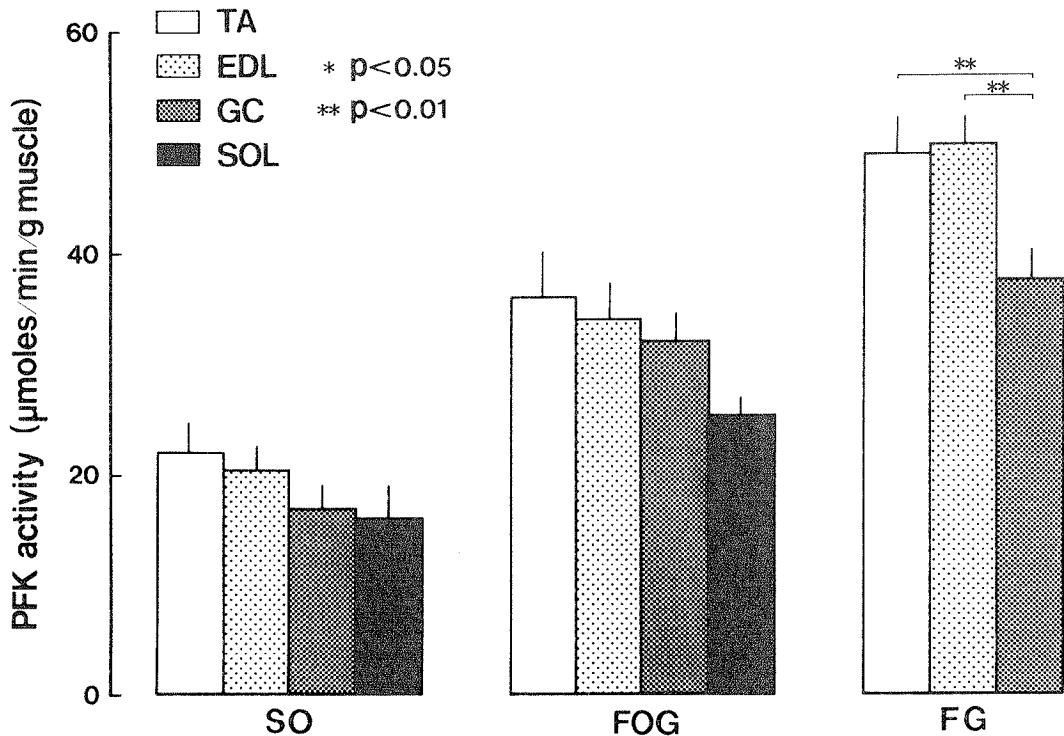


Figure 3. Phosphofructokinase (PFK) activity in each type of single muscle fibre of different types in various muscles. Abbreviations are the same as Figs. 1. and 2.

fast-twitch oxidative glycolytic ( FOG ), fast-twitch glycolytic ( FG ) の各筋線維タイプに分類した ( Fig. 1 )。筋線維タイプの分類に用いた以外の2本のうち1本により酵素活性値の定量を、またもう1本によりミトコンドリア容量の定量を行った。

## 2. 組織化学的分析

各筋の筋腹部分を OCT compound ( Ames Co. Ltd., U. S. A. ) にて包埋し、液体窒素により冷却したイソペンタンを用いて凍結した後、クライオスタットを用いておよそ 10 μm の連続横断切片を作成した。この試料に actomyosin ATPase 染料及び SDH 染色を施し、得られた標本を基に各筋線維を SO, FOG, FG の各タイプに分類した。筋全体を反映するように10カ所を無作為に選出し、筋線維タイプ別構成比率を筋線維数の比率及び面積比率により算出した。

## 3. 単一筋線維の酵素活性値の定量

酵素活性値の定量については、各単一筋線維をマイクロガラスホモジナイザー中にて完全にホモジナイズした後、Shonk and Boxer の方法<sup>14)</sup>により phosphofructokinase ( PFK, EC : 2.7.1.11 ) 及び Cooperstein et al.<sup>5)</sup>の方法により SDH ( EC : 1.3.99.1 ) の定量を行った。

## 4. 単一筋線維のミトコンドリア容量の定量

単一筋線維を電子顕微鏡による検索用に包埋し、長軸、横断両方向の切片を得て電子顕微鏡による観察、写真撮影を行った。最終的に撮影した電子顕微鏡写真は各単一筋線維で150~200枚に達し、これは立体的計測を行うには十分な枚数と判定した。得られた写真からステレオロジー (立体的) 計測法の一手法であるポイントカウンティング (点分析) 法<sup>19)</sup>により筋線維1本当りのミトコンドリア容量を測定した。すなわち、1本の筋線維から直接倍率5,000倍の写真を撮影し、約3倍に引き伸ばした像の上に1辺が1cmの格子をもつ測定紙を

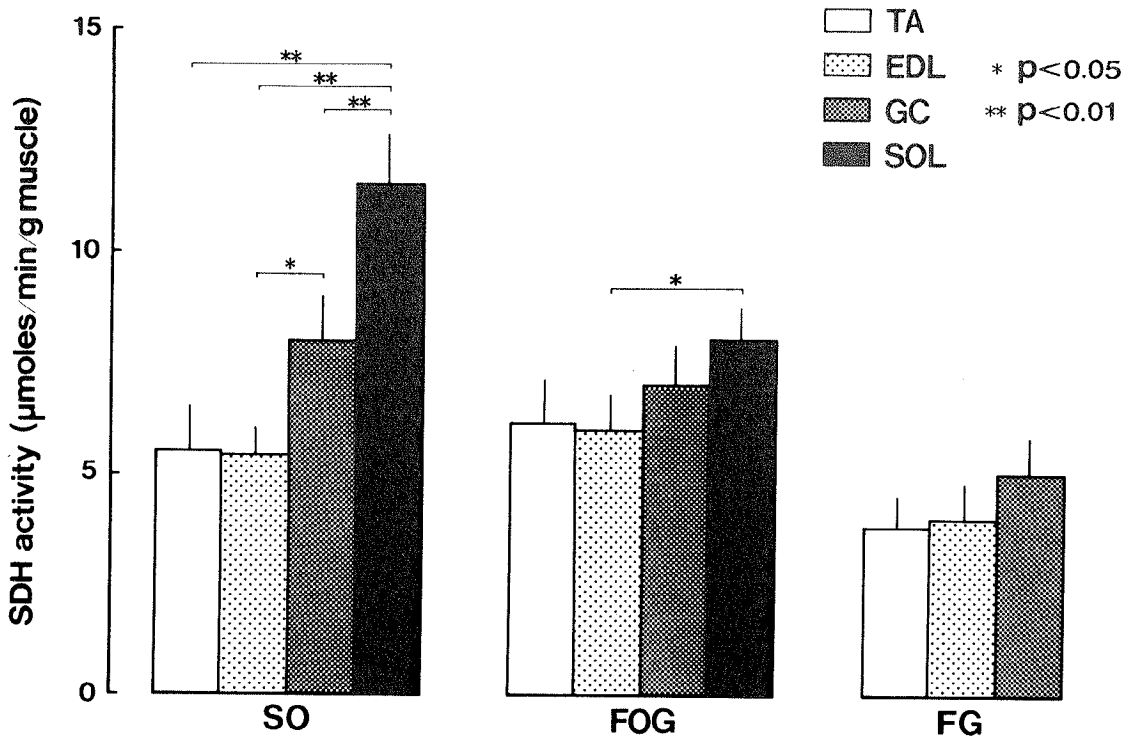


Figure 4. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in each type of single muscle fibres of different types in various muscles. Abbreviations are the same as Figs.1. and 2.

置いた。交差する分析点の総数は494個となり、ミトコンドリア上に重なる点の数を数え、総数(494)に対する比率としてミトコンドリア容量を算出した。

#### 5. 統計方法

総ての測定値における差の検定は student's t-test を用いて行い、いずれの場合も危険率5%未満をもって有意とした。

### 結果及び考察

Fig. 2 に本実験において被検筋に用いた4種類の骨格筋の筋線維タイプ別構成比率を線維数の比率と面積比率の両者によって示した。TA 並びに GC は同一筋内においても表層部と深層部では構成比率にかなりの差が認められるため、両者を分けて表示した。

いずれの骨格筋の筋線維タイプ別構成比率も従

来より報告されている結果<sup>1)</sup>とほぼ同様の値を示した。線維数の比率と面積比率を比較すると、特に EDL における FG 線維の面積比率が線維数の比率に比較して有意に ( $p < 0.01$ ) 高値を示したが、これは EDL の FG 線維の平均横断面積が特異的に高値を示したことに起因するものと思われる。実際、本研究においても FG 線維の平均横断面積は EDL, GC, TA の各骨格筋順に高値を示し、TA と EDL 間に有意な ( $p < 0.05$ ) 差が認められた。蛋白質合成速度が速筋線維と遅筋線維で異なるか否かは明らかでないが、DNA, mRNA レベルは遅筋線維が高値を示すと報告されている<sup>17)</sup>ことから、当然筋蛋白質合成速度に差が生ずる可能性は否定できない。

Fig. 3 に解糖系の酵素である PFK 活性値を各タイプの筋線維について4種類の骨格筋別に示した。SO, FOG 両線維についてはいずれも TA, EDL, GC, SOL の各骨格筋の順に高値を示したががいず

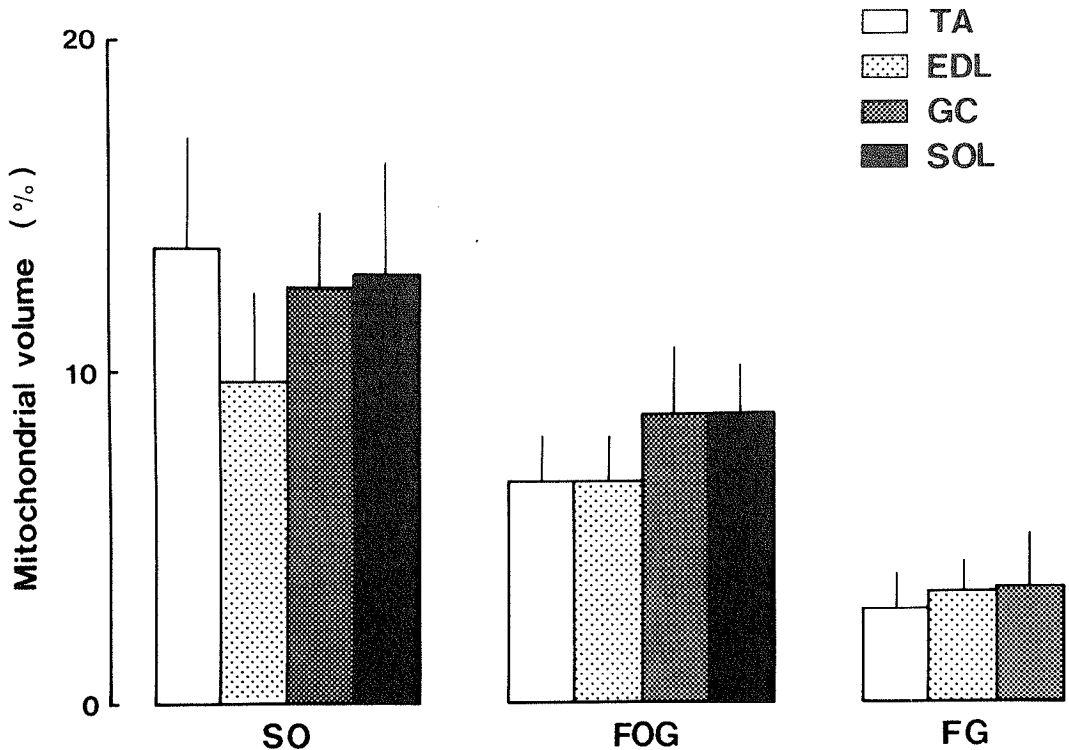


Figure 5. Mitochondrial volume (%) in each type of single muscle fibres of different types in various muscles. Abbreviations are the same as Figs 1. and 2.

れの骨格筋間にも有意な差は認められなかった。しかし、FG 線維については EDL, TA, GC の各骨格筋順に高値を示し、EDL, TA は GC に比較して有意に ( $p < 0.01$ ) 高値を示した。Fig. 4 には酸化系の酵素である SDH 活性値を各タイプの筋線維について 4 種類の骨格筋別に示した。SO 線維については SOL, GC, TA, EDL の各骨格筋の順に高値を示し、SOL と他の 3 種類の骨格筋間に有意な ( $p < 0.01$ ) 差が認められ、さらに GC と EDL 間にも有意な ( $p < 0.05$ ) 差が認められた。FOG 線維についても同様に SOL, GC, TA, EDL の各骨格筋の順に高値を示し、SOL と EDL 間に有意な ( $p < 0.05$ ) 差が認められた。FG 線維についてはいずれの骨格筋間にも有意な差は認められなかった。以上酵素活性値のパターンは 2 種類に大別して考えることができる。すなわち、解糖系酵素活性値は伸筋群 (TA, EDL) の速筋線維、特に FG 線維において高値を示す傾向が認め

られ、酸化系酵素活性値は屈筋群 (GC, SOL) の遅筋線維 (SO) 線維において高値を示した。一般的に骨格筋線維の機能的特性を支配している因子は神経系の因子 (neurotrophic effect) と体液性の因子であると報告されている<sup>6)</sup>。神経系の因子を後天的に排除、すなわち坐骨神経の除神経を行ったラット下肢骨格筋線維の代謝特性は酸化系優位になることが報告されている<sup>9)</sup>。一方、体液性の因子に関しては、長時間の甲状腺ホルモン(トリヨードサイロニン, サイロキシン)を投与することにより、筋線維の酸化系酵素活性値が上昇し、この移行とは全く独立に収縮特性が速筋タイプに移行することも報告されている<sup>18)</sup>。この両者の相互作用により、各骨格筋線維の代謝特性が決定されていると考えることができる。しかし、この代謝特性が先天的に遺伝子レベルにおいて決定されているのか、あるいは後天的に形成されてくるのかについては疑問な点が多い。成澤<sup>12)</sup>は組織化学的染

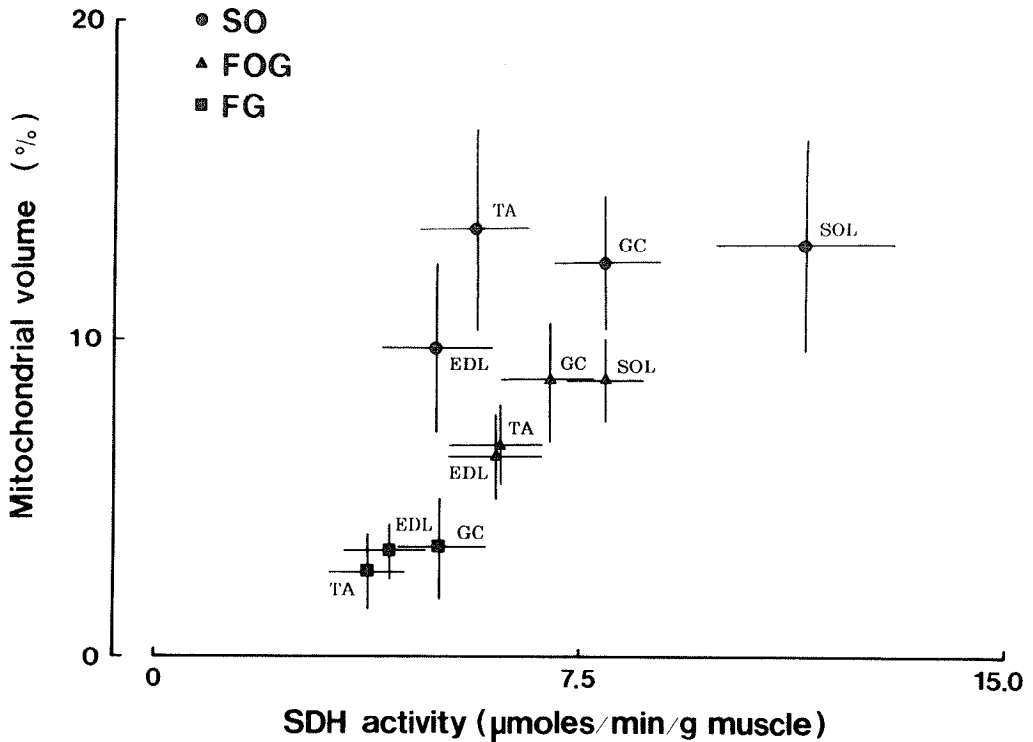


Figure 6. Relationship between SDH activity and mitochondrial volume in each type of single muscle fibres of different types in various muscles. Abbreviations are the same as Figs. 1. and 2.

色法を用いて、筋線維タイプ別構成比率の加齢変化を検討し、生後3週齢以前のラットの下肢骨格筋線維は酵素染色による筋線維タイプの判別が不可能であり、代謝特性を有しないと報告している。また、この理由として、生後3週齢以前は骨格筋線維の神経支配が多重神経支配であり、それ以降は単一神経支配に変化することによるものと報告している。さらに、後天的に神経支配を変化させるいわゆる交叉性神経支配によっても筋線維タイプが移行することが報告されている<sup>15)</sup>。したがって、本研究において認められた、骨格筋線維の骨格筋別の代謝特性は後天的に、その筋固有の運動(収縮)形態に伴い形成されてきたものであると考えられる。

Fig. 5には各タイプの筋線維におけるミトコンドリア容量を4種類の骨格筋別に表示し、Fig. 6には同様にミトコンドリア容量とSDH活性値の相互関

係を示した。本研究ではいずれのタイプの筋線維についても各骨格筋間にミトコンドリア容量の差は認められなかった。一般的に、筋線維の酸化能力はミトコンドリア容量に依存すると考えられている<sup>8)</sup>が、本研究では速筋線維については、両者の間に比例的な関係が認められたものの、遅筋線維については必ずしも比例的な関係が認められず、遅筋線維については酸化能力がミトコンドリア容量のみに依存する訳ではない可能性が示唆された。この点についてはクリステの密度、構造等のさらに詳細な検討を必要とするものと思われる。

## 結 論

異なる4種類の骨格筋(前頸骨筋、長指伸筋、腓腹筋、ヒラメ筋)より摘出した同一タイプの単一筋線維における解糖(PFK)・酸化(SDH)

両系酵素活性値とミトコンドリア容量を生化学的、組織化学的手法を用いて定量し、その相互関係を検討し以下に示す知見を得た。

1. PFK 活性値は FG 線維において EDL, TA, GC の各骨格筋の順に高値を示し、TA と GC 間、EDL と GC 間にそれぞれ有意な ( $p < 0.01$ ) 差が認められた。しかし、SO, FOG 両線維についてはいずれの骨格筋間にも有意な差は認められなかった。

2. SDH 活性値は SO 線維において SOL, GC, TA, EDL の各骨格筋の順に高値を示し、SOL と他の3種類の骨格筋間 ( $p < 0.01$ ) に、また GC と EDL 間 ( $p < 0.05$ ) にそれぞれ有意な差が認められた。一方 FOG 線維についても同様に SOL, GC, TA, EDL の各骨格筋の順に高値を示し、SOL と EDL の間に有意な ( $p < 0.05$ ) 差が認められた。FG 線維については各骨格筋間に有意な差は認められなかった。

3. ミトコンドリア容量についてはいずれのタイプの筋線維についても各骨格筋間に有意な差は認められなかった。

以上のような結果より、骨格筋線維の酸化能はミトコンドリア容量のみに依存しているわけではない可能性が示唆された。また、解糖系酵素活性値は特に伸筋群 (TA, EDL) の速筋線維 (FG, FOG) において高値を示し、酸化系酵素活性値は特に屈筋群 (GC, SOL) の SO 線維において高値を示したことから、骨格筋線維の代謝特性はその筋線維が存在する骨格筋が有する独自の運動形態によって後天的に形成される可能性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり英文抄録の御校閲に多大なる御示唆を頂きました聖マリアンナ医科大学 J. P. Barron 先生に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Armstrong, R. B. and Phelps, R. O.: Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, 171: 259-274, 1984.
- 2) Bárány, M.: ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, 50: 197-218, 1967.
- 3) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.: Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, 23: 369-379, 1970.
- 4) Brooke, M. H. and Kaiser, K. K.: Three myosin adenosine triphosphatase systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 670-672, 1970.
- 5) Cooperstein, S. T., Lazorow, A. and Kurfess, N. J.: A microphotometric method for determination of succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 186: 129-139, 1950.
- 6) Guth, L.: "Trophic" Influence of nerve on muscle. *Physiol. Rev.*, 48: 645-687, 1968.
- 7) Guth, L. and Samaha, F. J.: Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.*, 28: 365-367, 1970.
- 8) Holloszy, J. O. and Booth, F. W.: Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, 38: 273-91, 1970.
- 9) Jolesz, F. and Sreter, F. A.: Development, innervation, and activity-pattern induced changes in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, 43: 531-552, 1981.
- 10) 勝田 茂, 伊藤一生, 的場秀樹, 北浦 孝, 春日規克, 石原昭彦: 骨格筋線維タイプの特性とそれに影響を及ぼす因子 その1. 骨格筋線維の分類, 体力科学, 37: 345-357, 1988.
- 11) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., Souza, E. D., Cheng, C. S. and Seilgman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinate dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substitute ditrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 420-436, 1957.
- 12) 成澤三雄: 発育に伴うラット骨格筋線維の変動, 体力科学, 30: 103-113, 1981.
- 13) Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. and Stempel, K. E.: Metabolic profiles of three types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11: 2627-2633, 1972.
- 14) Shonk, C. E. and Boxer, G. E.: Enzyme patterns in human tissue I. Methods of the determination of glycolytic enzymes. *Cancer Res.*, 24: 709-721,



1950.

- 15) Sreter, F. A., Luff, A. R. and Gergly, J.: Effect of cross-innervation on physiological parameters and on properties of myosin and sarcoplasmic reticulum of fast and slow muscles of the rabbits. *J. Gen. Physiol.*, 66: 811-821, 1976.
- 16) Takekura, H. and Yoshioka, T.: Determination of metabolic profiles on single muscle fibres of different types. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 8: 342-348, 1987.
- 17) Tullson, P. C., John-Alder, H. B., Hood, D. A. and Terjung, R. L.: Do novo synthesis of adenine nucleotides in different skeletal muscle fiber types. *Am. J. Physiol.*, 255 (Cell Physiol., 24): C271-C277, 1988.
- 18) Vrbova, G., Godon, T. G. and Jones, R.: Nerve-muscle interaction. Chapman and Hall Ltd., London, 1978, pp. 147-165.
- 19) Weibel, E. R.: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int'l Rev. Cytol.*, 26: 235-302.