

トレーニングによる筋線維組成変化のバイオイメージングによる可視化 ～ 新たな研究モデル動物の創出 ～

森 秀一¹⁾

共同研究者 福永 大地²⁾, 中山 亮³⁾, 村瀬 尚哉²⁾, 重本 和宏¹⁾

¹⁾地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所・老年病研究チーム

²⁾東京理科大学大学院・薬学研究科

³⁾東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科

1. 緒言

骨格筋は主に遅筋線維、速筋線維の2つの線維から構成され、これらの線維が各々の筋ごとに一定の割合でモザイク状に配列している。遅筋線維は有酸素的なエネルギー発揮能力に優れ、収縮速度は遅いが疲労耐性が高いという特性を持つことから、持久的な運動に適していると考えられている。一方、速筋線維は無酸素的なエネルギー発揮能力に優れ、発揮する張力も高いことから、瞬発的な運動に適した能力を持つと考えられている。競技スポーツには、短距離のように瞬発力が求められる種目から、長距離のように持久力が必要とされる種目、さらにその両方が必要とされる混合型の種目もある。従って、各種目に適した筋線維組成を獲得することがパフォーマンスを上げるための必要条件であると考えられる。現時点では、陸上の短距離選手や長距離選手に認められるような非常に偏った筋線維組成は遺伝的要素が高いと考えられるが、骨格筋は運動トレーニングなど様々な環境因子に対し、後天的に筋線維タイプを変化させる可塑性・適応性を有している¹⁻³⁾。しかしながら、トレーニングによる筋線維組成の変化に関して、ヒトの場合では一致した見解が得られていない⁴⁻⁶⁾。この理由として、動物実験と比べて負荷する刺激の量(トレーニングの時間または期間)が少ないため、筋線維組成を変化させるには至らない可能性が挙げられる。加えて、ヒト骨格筋の筋線維組成の検討は、ニードルバイオプシーによる微量な筋断片を分析することが多いため、骨格筋全体の変化を正確に知ることが難しいことも一因であると思われる。それ故、筋線維組成の変化を対象とした研究を進める際には、今後も実験動物が重要な役割を果たしていくことは疑いようがない。

しかし、動物を用いた筋線維組成の解析においても技術上の制限が存在している。遅筋線維と速筋線維に大別される骨格筋線維は、各筋線維で優位に発現するミオシン重鎖(MyHC)のアイソフォームによってI、IIA、IID/X、IIBの4種類に細分化されている¹⁻³⁾。現在、筋線維タイプの同定には、これらのアイソフォームに対する特異的な抗体を用いた免疫染色法や、各アイソフォームが持つATPase活性の差(pH感受性)を利用した酵素染色法が用いられている^{7,8)}。これらの染色法の問題点は、生細胞を染色することができないということに加え、組織の固定によって染色性が大きく低下または消失するという点である。それ故、未固定の凍結切片を用いて染色が行われているが、複数の筋線維タイプを同定するためには連続切片を必要とする煩雑さがある。さらに、筋線維タイプが移行する際には、1本の筋線維中に複数のMyHCが混在するハイブリッドファイバーが出現して典型的な染色性を示さないことがあるため、誤った解釈をもたらす可能性がある。

本研究では、これらの制限に打ち勝つため、蛍光タンパクを用いて各筋線維タイプを特異的に可視化する遺伝子改変マウスを作製した。さらに、これらのマウスが筋線維組成の変化を対象とした研究

において有用であることを示すため、トレーニングによる骨格筋線維の遅筋化を蛍光タンパクの発色変化として観察した。

2. 研究方法

2.1 実験動物

MyHC I-YFP ノックインマウスは National Institute of Health から入手した。また、ノックインマウスの繁殖には日本 SLC から購入した C57BL/6 マウスを使用した。マウスの飼育環境は 12 時間の明暗サイクル (8:00 明期開始-20:00 暗期開始) で室温は約 23 °C に維持され、水および飼料は自由摂取とした。尚、全ての動物実験は東京都健康長寿医療センターの動物実験委員会の承認を得て行った。

2.2 MyHC IIa-Sirius、MyHC IIb-mCherry ノックインマウスの作製

ノックインマウスのターゲティングベクターを作製するため、BACPAC Resources から雄性 C57BL/6J マウスの BAC クローンである RP24-149P22 と RP24-374D24 を購入し、MyHC IIa と IIb 遺伝子の標的とするゲノム配列をそれぞれサブクローニングした。BAC 配列のサブクローニングには Red/ET recombination BAC subcloning kit (Gene Bridges) を使用し、ネガティブ選択用のマーカー (MC1-TK) が挿入されたプラスミド (PL253) に約 10 kb のゲノム DNA を導入した。青色蛍光タンパクである Sirius と赤色蛍光タンパクである mCherry の cDNA 配列を PCR でクローニングし、それぞれ MyHC IIa と IIb 遺伝子の翻訳開始配列 (ATG) とコドンのフレームを合わせて 5' 側に挿入した。尚、mCherry cDNA の鋳型として pmCherry-N1 (Invitrogen) を使用し、Sirius cDNA の鋳型とした pcDNA3-Sirius は北海道大学電子科学研究所 (当時) の永井健治教授より供与された⁹⁾。また、FRT 配列で挟んだ PGK-gb2-Neomycin cassette (Gene Bridges) をポジティブ選択用のマーカーとしてターゲティングベクターに挿入した (図 1)。直鎖状にしたターゲティングベクターをエレクトロポレーションでマウス ES 細胞に導入し、G418 でポジティブ選択を行った後、PCR とサザンブロットで相同組換えを起こした ES クローンを同定した。同定した ES クローンをを用いてアグリゲーション法によりキメラマウスを作製し、雌性の C57BL/6 との交配で得られた産仔のジェノタイプピングを行って生殖系列への移行を確認した。

2.3 免疫組織染色

マウスから採取した下肢骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋) を液体窒素で冷却したイソペンタン内で凍結し、クリオスタットで厚さ 8 μ m の横断切片を作製した。風乾した切片を洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS で 15 分間固定した。固定後に切片を洗浄し、メタノールで透過処理 (-20 °C, 10 分) を行った後に 1% BSA/5% normal goat serum/PBS でブロッキング処理を行った (室温, 1 時間)。その後、1 次抗体反応を 4 °C、overnight で行い、切片を洗浄した後に 2 次抗体反応を室温で 90 分間行った。抗体の希釈には 1% BSA/PBS を使用し、切片の洗浄には全て PBS を用いた。2 次抗体反応後に洗浄した切片を退色防止剤 (SlowFade Antifade kit, Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡 (Leica DMI6000, Leica Microsystems) で 10 倍または 20 倍の対物レンズを用いて観察した。尚、蛍光タンパクの発色を示す疑似カラーとして、Sirius はシアン、YFP は緑を用いた。また、各筋線維タイプを染色するために下記の抗体を使用した (表 1)。

表 1. 免疫組織染色用抗体一覧

	1 次抗体クローン	供給元	使用濃度	2 次抗体 ³
Type I	BA-F8	DSMZ ¹	12 µg/ml	Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG2b
Type IIA	SC-71	DSMZ ¹	3 µg/ml	Alexa Fluor 647 anti-mouse IgG1
Type IID/X	6H1	DSHB ²	1 : 20	Alexa Fluor 488 anti-mouse IgM
Type IIB	BF-F3	DSMZ ¹	1 : 20	Alexa Fluor 488 anti-mouse IgM

¹ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

² Developmental Studies Hybridoma Bank

³ 二次抗体は全て Invitrogen から購入し、1 µg/ml の濃度で使用した。

2.4 マウスの自発運動トレーニング

自発運動トレーニングには 11 週齢の MyHC IIA-Sirius/MyHC IIB-mCherry ダブルノックインマウス 3 匹 (♂1 匹, ♀2 匹) と 16 週齢の MyHC I-YFP/MyHC IIA-Sirius ダブルノックインマウス (♂3 匹) を用いた。ランニングホイールを取り付けたケージ (ROC-100, シンファクトリー) にマウスを一匹ずつ入れ、8 週間飼育して自発走運動を行わせた。飼育中のマウスの走行量は、ホイールと接続されたデータ取得装置 (ACTIMO-DATA II, シンファクトリー) を用いて継続的に測定された。また、それぞれ同週齢のダブルノックインマウスをコントロール群とし、3~4 匹を通常のケージに入れて飼育した。8 週間の飼育後に両群のマウスから下肢骨格筋を採取し、クリオスタットで横断切片 (8 µm) を作製して筋線維タイプの解析を行った。

2.5 統計解析

各解析により得られた結果は、平均値 ± 標準誤差として表した。コントロール群と自発運動トレーニング群との有意差は student の t 検定を用いて検討し、全ての検定において有意水準は 5%以下とした。

3. 結果

3.1 筋線維タイプ特異的な蛍光発色を示すノックインマウスの作製

骨格筋の I 型線維に発現する MyHC I は、心筋に発現する β -cardiac MyHC と同じ遺伝子 (MYH7) から転写・翻訳されるアイソフォームである³⁾。2006 年に Pandya らが β -cardiac MyHC 遺伝子に YFP を付加し、心筋が選択的に発色するノックインマウスを作製しているが¹⁰⁾、本研究では最初にこのノックインマウスの骨格筋で選択的に YFP が発色しているかを確認した。ノックインマウスのヒラメ筋と足底筋を採取して実体顕微鏡で観察した結果、4 割程度の筋線維が I 型で占められているヒラメ筋で YFP の発色が認められた。対照的に、I 型線維の比率が 1%未満とされる足底筋では明確な YFP の発色を確認することはできず、I 型線維特異的に YFP が発色していると考えられた (図 2A)。それ故、このノックインマウスのターゲティングベクターを参考にして、速筋線維である IIA 型線維または IIB 型線維を選択的に発色させるノックインマウスを作製した。

ノックインマウスの作製に際して、黄色蛍光タンパクである YFP との識別を明確にするため、IIA 型線維と IIB 型線維の発色には青色蛍光タンパクの Sirius と赤色蛍光タンパクの mCherry をそれぞれ

用いた。作製した MyHC-IIb ノックインマウスのヒラメ筋と足底筋を採取して実体顕微鏡で観察すると、約半数の筋線維が IIB 型で占められている足底筋で mCherry の発色が認められ、IIB 型線維がほとんど存在しないヒラメ筋ではその発色を確認することができなかった(図 2A)。また、ヒラメ筋では約 5 割、足底筋でも約 2 割の比率で IIA 型線維が存在しているが、MyHC IIA-Sirius ノックインマウスから採取した筋では、Sirius の発色を実体顕微鏡で明確に観察することはできなかった。しかし、採取した筋(横隔膜)を蛍光顕微鏡で観察すると、他のノックインマウスと同様に蛍光の発色を観察することが可能であった(図 2B)。従って、蛍光タンパクの特性に依存して実体顕微鏡での観察に可否があるものの、各筋線維タイプが選択的に発色していると考えられた。尚、これらノックインマウスでの発色は全てヘテロ接合体の状態を観察可能であった。

3.2 蛍光発色の筋線維タイプ特異性の確認

次に、発色している蛍光タンパクの筋線維タイプ特異性を確認するため、3 種類のノックインマウスから腓腹筋を採取して凍結切片を作製し、各 MyHC に対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。各抗体での染色後、ランダムに 3 視野の画像を取得し、蛍光タンパクの発色に対する抗体染色の適合率を解析した。

MyHC I-YFP マウスでは、全ての YFP 発色線維が MyHC I に対する抗体によって染色された。また、MyHC IIA に対する抗体で染色される YFP 発色線維がわずかに認められたが (2.7%)、MyHC IId/x または IIB に対する抗体で染色された発色線維は認められなかった(図 3A)。また、MyHC IIA-Sirius マウスでは、MyHC I に対する抗体で染色される Sirius 発色線維がわずかに存在していたが (0.4%)、発色線維の 93%が MyHC IIA に対する抗体によって染色された。一方、MyHC IId/x または IIB に対する抗体で染色される発色線維は認められなかった(図 3B)。対照的に、MyHC IIB-mCherry マウスでは、MyHC I または IIA に対する抗体で染色される mCherry 発色線維は認められず、発色線維の 91%が MyHC IIB に対する抗体で染色された。また、発色線維の 5.4%は MyHC IId/x に対する抗体でも染色された(図 3C)。

以上の結果から、3 種類のノックインマウスの骨格筋における蛍光タンパクの発色が、それぞれの筋線維タイプに対応して非常に高い特異性を有していることが示された。

3.3 トレーニングによる筋線維タイプの変化が蛍光発色に及ぼす影響

さらに、これらノックインマウスの有用性を示すため、骨格筋が持つ可塑性や適応性を蛍光タンパクの発色を用いて観察した。骨格筋の活動水準の増加によって、筋線維タイプ組成は速筋線維の割合が減少し、対照的に遅筋線維の割合が上昇すると知られている¹⁻³⁾。それ故、MyHC IIA-Sirius マウスと MyHC IIB-mCherry マウスを交配してダブルノックインマウスを作製し、ランニングホイールを用いた自発走トレーニングを 8 週間行わせて筋線維タイプの遅筋化を誘導した。尚、MyHC IIA-Sirius/MyHC IIB-mCherry ダブルノックインマウスの平均走行量は 9.4 ± 0.9 km/日だった。トレーニング終了後に足底筋を採取して筋切片を作製し、筋線維タイプ組成を解析してコントロール群の足底筋と比較した。図 4A に示したように、ダブルノックインマウスの足底筋は Sirius と mCherry の両方の発色が認められることから、これらの発色線維をそれぞれ IIA 型線維または IIB 型線維とした。また、マウスの足底筋に占める I 型筋線維の割合は非常に低いため、未発色の筋線維を IID/X 型線維と見なした。切片内の全筋線維を解析した結果、自発走トレーニング群で Sirius 発色線維の割合に顕著な増加が認められ(コントロール群: $26.6 \pm 0.7\%$, トレーニング群: $49.6 \pm 3.4\%$, $p < 0.01$)、対照的に mCherry 発色線維の

割合が有意に減少していた (コントロール群: $52.1 \pm 3.4\%$, トレーニング群: $28.6 \pm 7.3\%$, $p < 0.05$) (図 4B)。従って、MyHC の組成変化による筋線維タイプの遅筋化を蛍光タンパクの発色変化として観察可能であることが示された。

次に、同様の自発走トレーニングを MyHC I-YFP/MyHC IIa-Sirius ダブルノックインマウスにも行わせ、筋線維タイプの変化を検討した (平均走行量: 4.9 ± 0.5 km/日)。トレーニング終了後の足底筋の切片を観察すると、IIA 型線維を示す Sirius の発色線維が増加しており、MyHC IIa-Sirius/MyHC IIb-mCherry ダブルノックインマウスと同様に筋線維タイプの遅筋化が生じていると考えられた (図 5A)。さらに、これらのダブルノックインマウスから採取したヒラメ筋の筋切片を観察すると、YFP と Sirius の両方を発色する筋線維の割合がトレーニング群で有意に上昇していた (コントロール群: $2.6 \pm 0.8\%$, トレーニング群: $15.5 \pm 0.6\%$, $p < 0.01$) (図 5B)。活動水準の増加によって筋線維組成が変化するには、筋線維タイプの遅筋化とともに複数の MyHC アイソフォームが混在したハイブリッドファイバーが増加すると知られている¹⁻³⁾。従って、YFP と Sirius の共発色線維は、MyHC I と MyHC IIa を含むハイブリッドファイバーを表していると考えられた。

4. 考察

骨格筋は非常に可塑性に富んだ組織であり、その活動水準が増加すると肥大し、逆に低下すると細く萎縮する。さらに量的変化だけでなく、質的变化として筋線維タイプの変化が認められる。本研究では、蛍光タンパクを用いて骨格筋の各筋線維タイプを選択的に可視化し、その質的变化を蛍光タンパクの発色変化として観察可能な遺伝子改変マウスを作製した。

本研究で筋線維タイプの標識に用いた YFP、Sirius、mCherry の蛍光スペクトルは比較的オーバーラップする領域が少ないため^{9,11)}、一般的な蛍光顕微鏡の波長フィルターを使用して容易に識別することが可能である。蛍光強度の低さのために実体顕微鏡下では IIA 型線維の Sirius の発色を確認することはできなかったが、Sirius は既存の蛍光タンパクでは最も短波長で発色するという特徴がある⁹⁾。筋線維タイプの変化を蛍光タンパクの発色変化として解析するには、他の蛍光タンパクとの識別が重要となるため、Sirius が持つ蛍光スペクトルの特性が有用ではないかと考えられる。一方、切片を用いた筋線維タイプの解析では、従来の免疫染色法と比較して明らかな利点が示された。経験的ではあるが、IID/X 型または IIB 型線維は IgM サブクラスの抗体を用いて染色するため、IgG サブクラスの抗体を用いる I 型や IIA 型線維と比較して検出感度がやや低くなると感じている。さらにマウスの場合、健常な筋においても複数の MyHC アイソフォームが混在するハイブリッドファイバーがある程度存在すると報告されている^{12,13)}。筋線維の MyHC の総発現量に大きな差がないとすれば、単独の MyHC アイソフォームを発現する筋線維と比較して、ハイブリッドファイバーでの各々の MyHC アイソフォームの発現量は必然的に低くなる。それ故、抗体では明確に染色されない筋線維がある程度存在すると考えられる。本研究のノックインマウスで蛍光タンパクの発色に対する筋線維タイプの特異性を確認すると、わずかな割合ではあるが、蛍光タンパクを付加した MyHC アイソフォームと抗体染色によって同定される筋線維タイプに差異が認められた。しかし上記のことを考慮すると、本研究の結果は、蛍光タンパクの筋線維タイプ特異性に問題があることを示すものではなく、ノックインマウスによって非常に高い感度で筋線維タイプの同定が可能になったことを示していると思われる。また、免疫染色でハイブリッドファイバーを同定するには、蛍光標識二次抗体による二重染色とともに染色性の強弱が現れるのが特徴である¹⁴⁾。本研究の MyHC I-YFP/MyHC IIa-Sirius マウスのヒラメ筋では、ハイ

ブリッドファイバーが YFP と Sirius の共発色線維として同定された。加えて、共発色線維では YFP または Sirius どちらか一方の発色が低下しており、蛍光タンパクの発色強度が MyHC アイソフォームのタンパク発現量を反映していると考えられる。MyHC Ila-Sirius/MyHC I Ib-mCherry マウスの足底筋では、Sirius の発色には明らかに濃淡が認められており、MyHC IId/x が混在するハイブリッドファイバーを表している可能性が高い。今後、蛍光タンパクの発色強度を解析することで MyHC アイソフォームの発現量を定量し、ハイブリッドファイバーを同定することが可能になるかもしれない。

今後、作製したノックインマウスを用いて幅広く研究を展開していくためには、マウスの表現型に異常が認められないことが重要である。すでに作製されていた MyHC I-YFP マウスは骨格筋に加えて心筋でも YFP が発現しているが、これまで心機能の異常は報告されていない¹⁰⁾。In vitro の解析でも、N 末端側への GFP の付加は MyHC の ATPase 活性に対して影響がないと報告されている¹⁵⁾。本研究で作製したノックインマウスにおいても、現在までのところ、成長障害や死亡率の増加は認められていない。また、ランニングホイールを用いて自発走トレーニングを行わせたが、その走行量はワイルドタイプのマウスを用いた他の研究結果と比較しても遜色ないものであった^{16,17)}。加えて、MyHC Ila-Sirius/MyHC I Ib-mCherry マウスの mCherry 発色を指標とした IIB 型線維の割合は 52%であり、40~60%と報告されている先行研究の結果と一致している^{14,18,19)}。以上の結果から、蛍光タンパクの発色によって骨格筋の機能・形態に障害が生じている可能性は非常に低いと考えられる。しかしながら、mCherry タンパクは in vivo では凝集しやすい傾向があり、それによって毒性を示す可能性が指摘されている²⁰⁾。マウスを含め小動物では骨格筋全体に占める速筋の割合が多いため、mCherry の発現が及ぼす影響を完全に無視することはできない。それ故、ノックインマウスの骨格筋を長期にわたって詳細に検討する必要があるかもしれない。

有酸素性トレーニングによる持久力の向上は筋線維タイプの遅筋化だけでなく、ミトコンドリア量の増加や脂質酸化能の充進などエネルギー産生効率の上昇も関与している。近年、これらの変化が転写共役因子である PGC-1 α によって制御されていることが明らかとなっており²¹⁾、筋の収縮特性と代謝特性が密接に関連していることを示している。実際に、肥満症患者の筋では酸化的代謝能の低下と解糖的代謝能の上昇が認められているが、同時に遅筋線維の割合低下も生じている。それ故、筋線維タイプ組成の差が肥満の傾向度に影響している可能性も考えられている²²⁾。以上のことから、筋線維タイプ組成の解析によって得られる情報はスポーツパフォーマンスの評価だけでなく、生活習慣病の病態機序の解明にも繋がっていく可能性が高い。筋線維タイプを容易に解析できる本研究のノックインマウスは、これらの研究分野において非常に有用なツールになると思われる。

5. 結語

本研究では、蛍光タンパクを用いて骨格筋の各筋線維タイプを特異的に可視化する遺伝子改変マウス (ノックインマウス) を作製した。各々のノックインマウスの筋線維タイプに対する蛍光タンパクの発色は非常に特異性が高く、免疫染色法による筋線維タイプの同定法と比較して非常に高い感度を有していた。また、運動トレーニングによる筋線維タイプの遅筋化を蛍光タンパクの発色変化として観察することが可能であった。さらに、複数の MyHC アイソフォームが混在したハイブリッドファイバーを蛍光タンパクの共発色線維として同定することが可能であった。従って、本研究で作製したノックインマウスは、筋線維組成の変化を対象とした研究を進める上で非常に有用なツールになると思われる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、多大な研究助成をいただきました公益財団法人ミズノスポーツ振興財団に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Pette D, et al.: Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*, 50: 500-9, 2000.
- 2) Pette D.: Historical perspective: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 90: 1119-24, 2001.
- 3) Shiaffino S, et al.: Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91: 1447-531, 2011.
- 4) Andersen JL, et al.: Myosin heavy chain isoforms in single fibers from m.vastus lateralis of sprinters: influence of training intensity. *Acta Physiol Scand*, 151: 135-42, 1994.
- 5) Trappe SW, et al.: Skeletal muscle characteristics among distance runners; a 20-yr follow-up study. *J Appl Physiol*, 78: 823-9, 1995.
- 6) Harridge SDR, et al.: Sprint training, in vitro and in vivo muscle function, and myosin heavy chain expression. *J Appl Physiol*, 84: 442-9, 1998.
- 7) Brooke MH, et al.: Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem*, 18: 670-2, 1970.
- 8) Smerdu V, et al.: Demonstration of myosin heavy chain isoforms in rat and humans: the specificity of seven available monoclonal antibodies used in immunohistochemical and immunoblotting methods. *Eur J Histochem*, 52: 179-90, 2008.
- 9) Tomosugi W, et al.: An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat Methods*, 6: 351-3, 2009.
- 10) Pandya K, et al.: Fibrosis, not cell size, delineates β -myosin heavy chain reexpression during cardiac hypertrophy and normal aging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 16864-9, 2006.
- 11) Shaner NC, et al.: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2: 905-9, 2005.
- 12) Glaser B, et al.: Relative proportions of hybrid fibers are unaffected by 6 weeks of running exercise in mouse skeletal muscles. *Exp Physiol*, 95: 211-21, 2010.
- 13) Zhang MY, et al.: The continuum of hybrid IIX/IIB fibers in normal mouse muscles: MHC isoform proportions and spatial distribution within single fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299: R1582-91, 2010.
- 14) Bloemberg D, et al.: Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS ONE*, 7: e35273, 2012.
- 15) Moores SL, et al.: Myosin dynamics in live Dictyostelium cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 443-6, 1996.
- 16) Allen DL, et al.: Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 90: 1900-8, 2001.
- 17) Harrison BC, et al.: Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. *J Appl Physiol*, 92: 313-22, 2002.
- 18) Allen DL, et al.: Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory

- hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C637-45, 2001.
- 19) Geng T, et al.: PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298: C572-9, 2010.
- 20) Strack RL, et al.: A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods*, 5: 955-7, 2008.
- 21) Lin J, et al.: Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibers. *Nature*, 418: 797-801, 2002.
- 22) Maltin CA.: Muscle development and obesity: is there a relationship? *Organogenesis*, 4: 158-169, 2008.

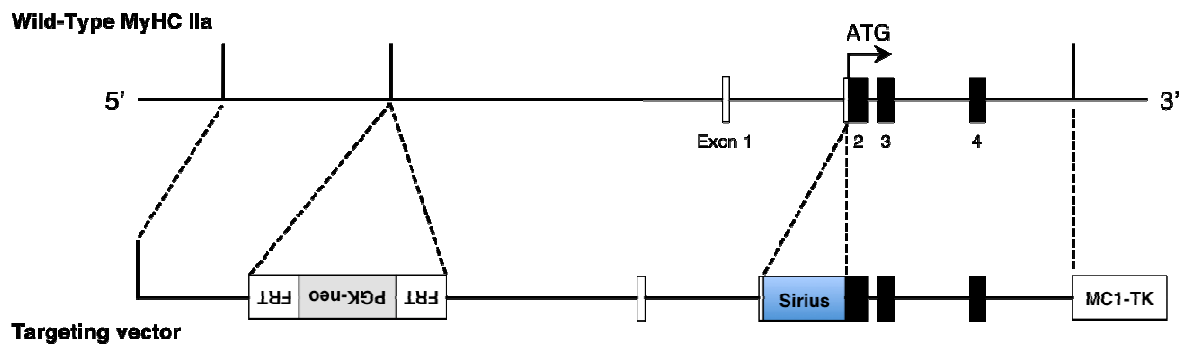
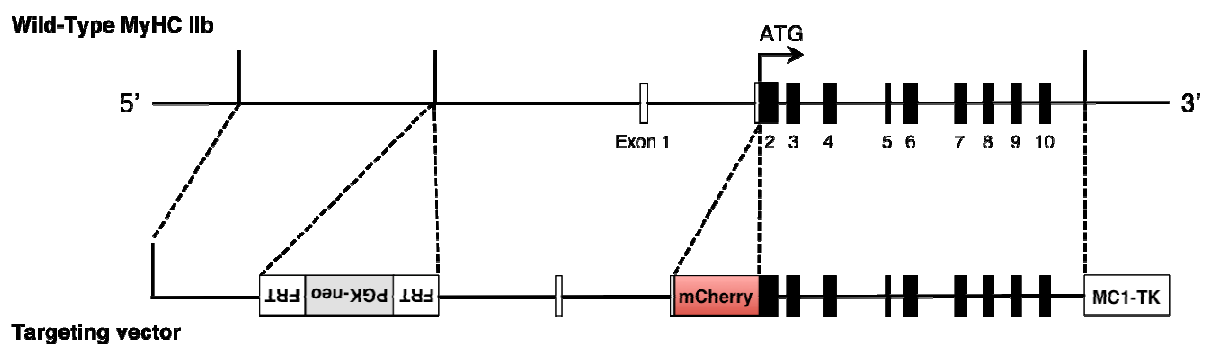
A**B**

図 1. ノックインマウスのターゲティングベクター。
 (A) MyHC Ila-Sirius マウス. (B) MyHC Iib-mCherry マウス.

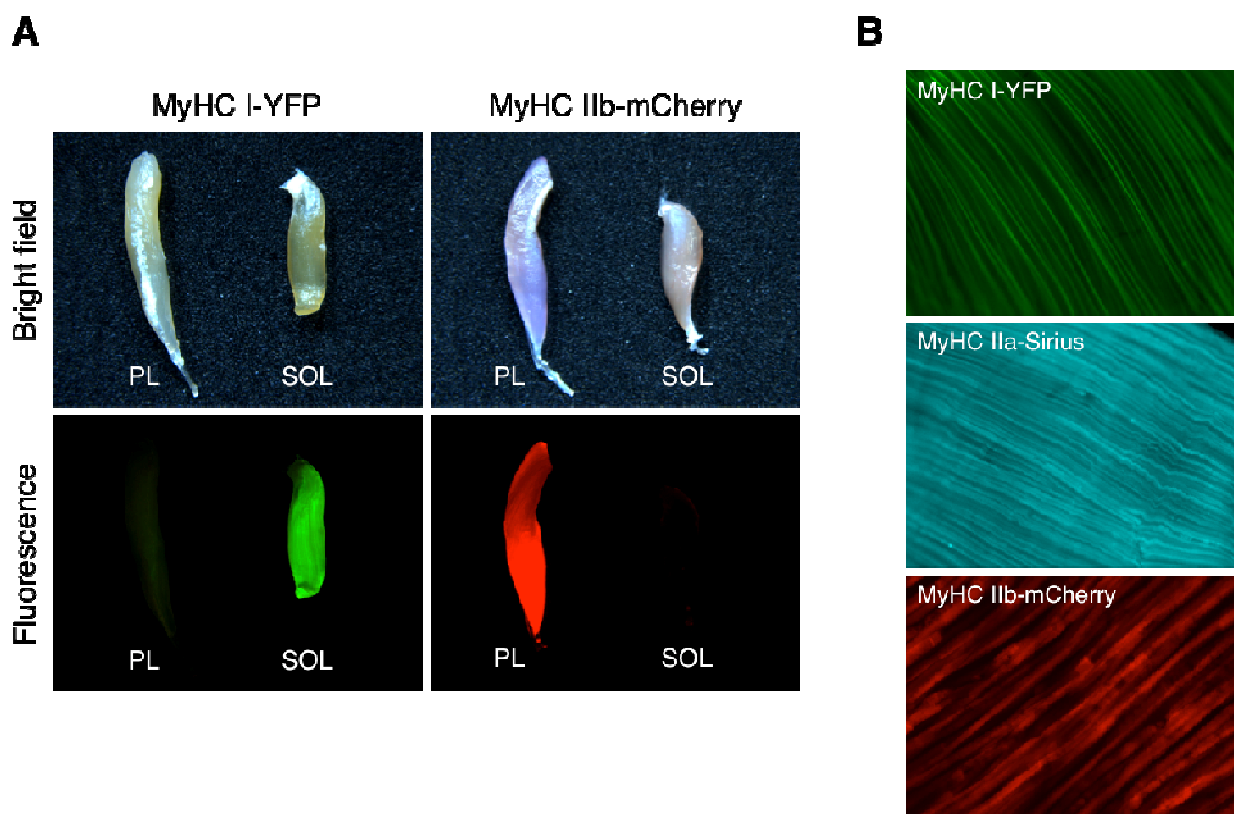


図2. ノックインマウスの蛍光タンパクの発色.

(A) 実体顕微鏡による足底筋 (PL) とヒラメ筋 (SOL) の観察. (B) 蛍光顕微鏡による横隔膜の観察.

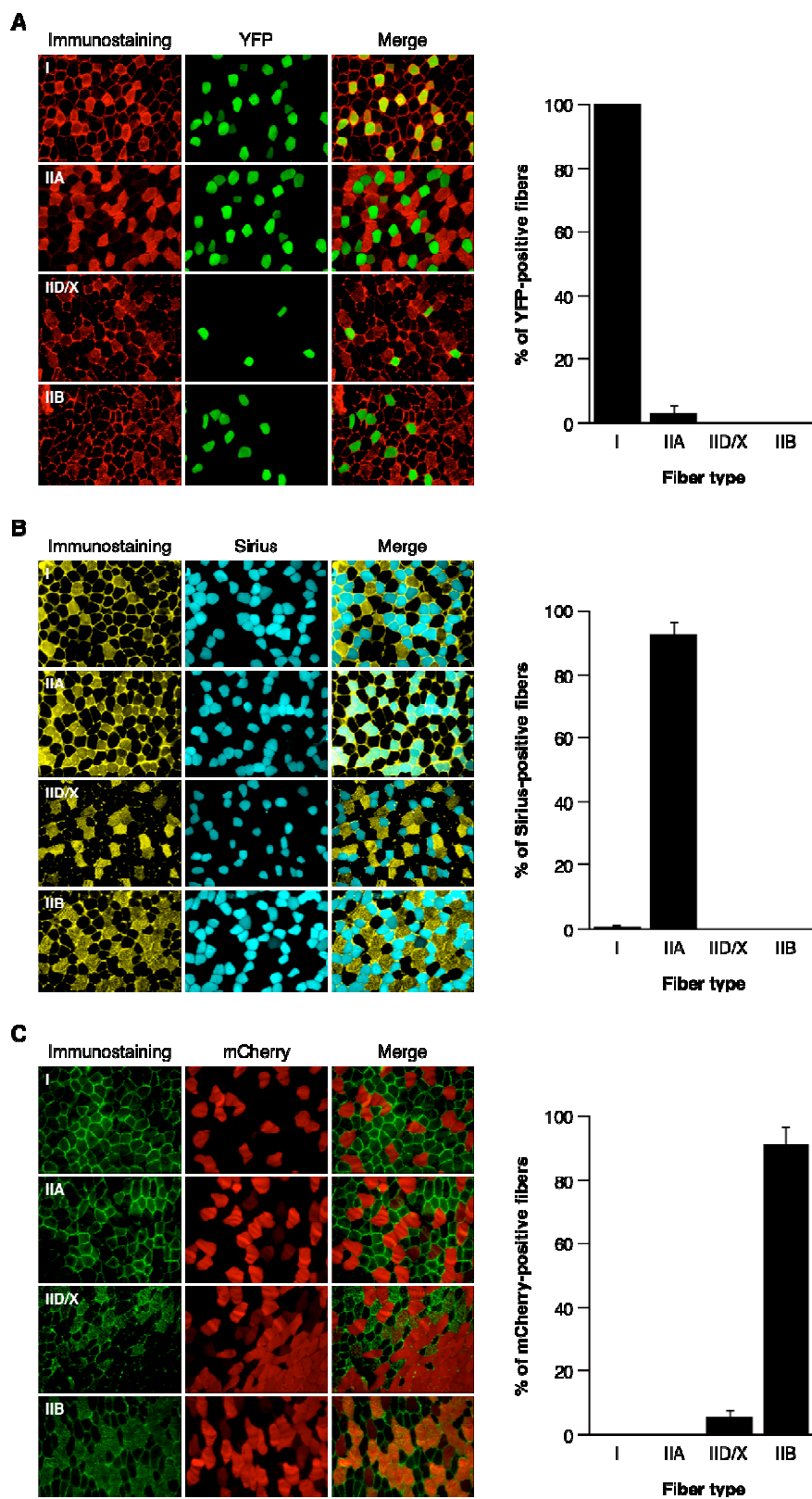


図 3. ノックインマウスの蛍光タンパク発色の筋線維タイプ特異性の確認。

(A) MyHC I-YFP マウス. (B) MyHC IIA-Sirius マウス. (C) MyHC IIB-mCherry マウス.

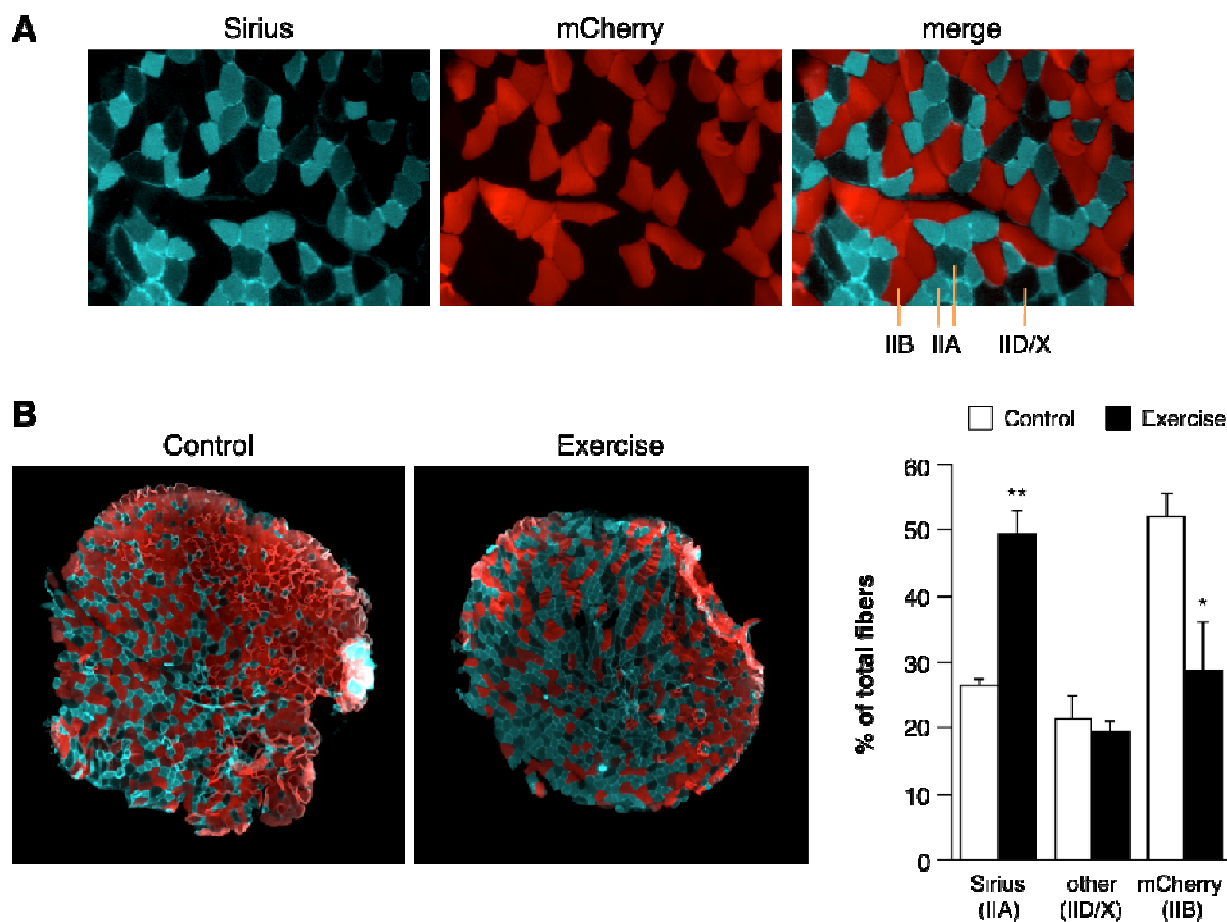


図4. 自発走トレーニングによる MyHC IIa-Sirius/MyHC IIb-mCherry マウスの骨格筋の変化.

(A) 足底筋における Sirius と mCherry の発色. (B) 足底筋の筋線維タイプの遅筋化 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control).

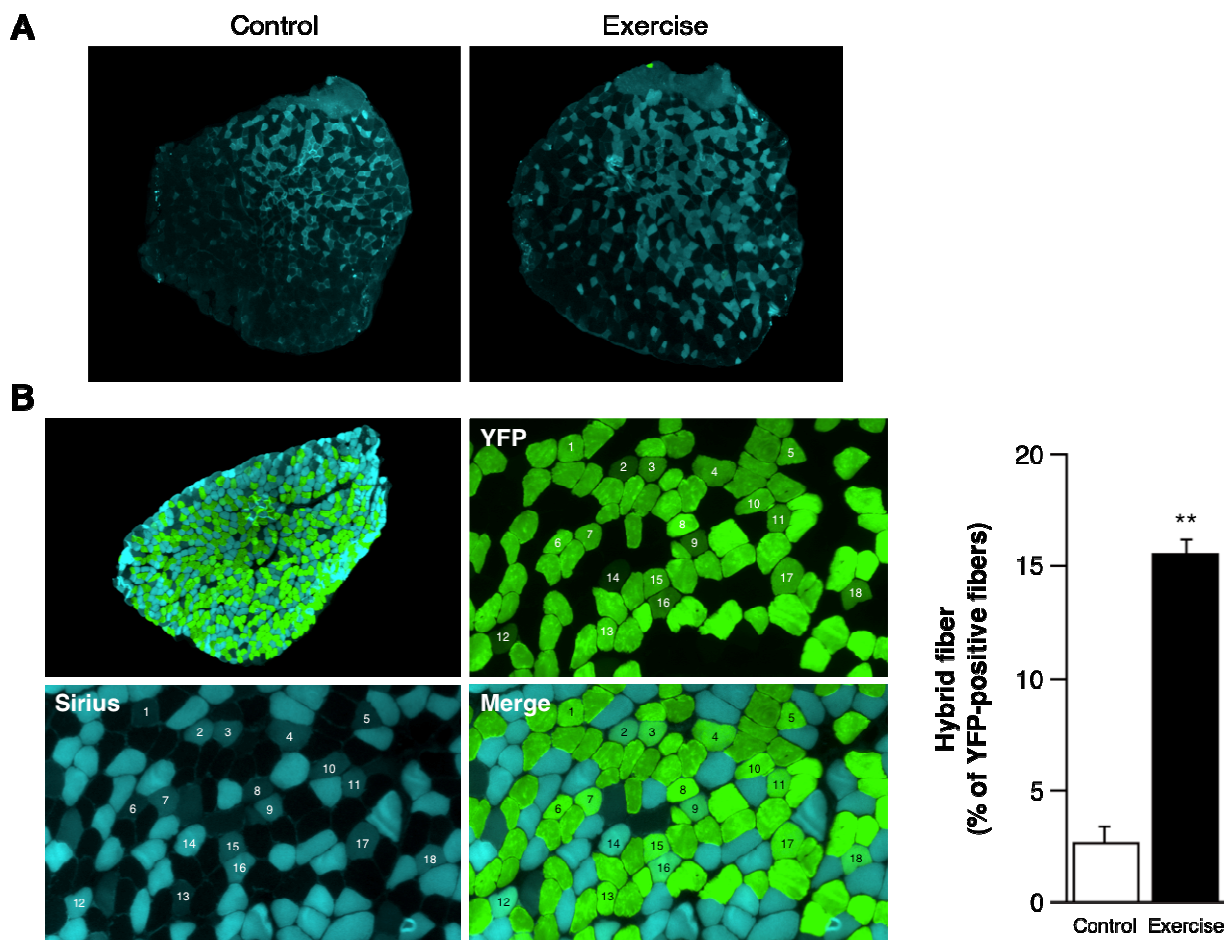


図5. 自発走トレーニングによる MyHC I-YFP/MyHC IIa-Sirius マウスの骨格筋の変化.

(A) 足底筋の遅筋化. (B) ヒラメ筋でのハイブリッドファイバーの増加. 画像上の数字は対応するハイブリッドファイバーを示している (** $p < 0.01$ vs. control).