

ラット内喉頭筋における superfast myosin heavy chain の発現

塩谷 彰 浩¹⁾・福田 宏 之¹⁾・神 崎 仁¹⁾・Paul W. Flint²⁾

Superfast Myosin Heavy Chain in Rat Laryngeal Muscles

Akihiro Shiotani¹⁾, Hiroyuki Fukuda¹⁾, Jin Kanzaki¹⁾
and Paul W. Flint²⁾

The existence of superfast myosin heavy chain (MHC), found in jaw-closing muscle and extraocular muscle (EOM), was also found in rat laryngeal muscles. Immunostaining and western blot using anti-EOM superfast MHC antibody were performed to identify and localize superfast MHC in rat laryngeal muscles. Specific reactivity of laryngeal II L MHC was confirmed by western blot. By immunostaining, all fibers in the thyroarytenoid muscle reacted with EOM superfast MHC antibody. A scattered pattern of positive fibers was observed in the vocalis, the posterior cricoarytenoid and the lateral cricoarytenoid muscles. EOM superfast MHC was not detected in the cricothyroid muscle. Co-expression of EOM superfast MHC and type II B MHC was observed, and expression of EOM superfast MHC was seen in laryngeal muscle innervated only by recurrent laryngeal nerve, with the highest density of EOM superfast MHC in the thyroarytenoid muscle. The expression of EOM superfast MHC in rat laryngeal muscle is consistent with the functional demands for airway protection and glottic closure reflex. The MHC phenotype, or relative composition of myosin heavy chains, reflected the physiologic demands on each laryngeal muscle.

Key words: 内喉頭筋, ミオシン重鎖, ラット, ウエスタンブロット, 声門閉鎖反射

はじめに

猫における筋の最大収縮速度を contraction time を指標にして比べてみると、後肢の速筋の速さ (25ms)¹⁾ にくらべ、jaw-closing muscle (11~13ms)²⁾, extraocular muscle (EOM) (7.5~10ms)³⁾ は明らかに速いことが報告されている。内喉頭筋についても、特に甲狀披裂筋 (TA) (9~21ms)^{4, 5)} も明らかに速いといえる。筋の最大収縮速度を決定する蛋白のひとつに myosin heavy chain (MHC) 蛋白があり^{6~8)}, MHC の発現型や組成割合はその筋に対する機能的要求を反映するとされる^{9, 10)}。下肢の速筋よりもさらに速い筋の存在は、下肢の速筋とは異なったさらに速い収縮速度をもつ MHC の存在を示唆している。近年、四肢の速筋より明らかに速い収縮速度を持つ、新しい type の MHC が発見され、superfast MHC と名付けられた。これは、猫の jaw-closing muscle¹¹⁾、牛、猫、ラットの EOM¹²⁾ で発見された。

本研究の対象となったラットの骨格筋における MHC は現在までに、slow type の type I, fast type の type II A, II X, II B が SDS-PAGE 法や免疫組織染色法により確認されている¹³⁾。superfast type については EOM に存

在する type EOM が確認されているのみである¹²⁾。

一方、ラット喉頭において、1995年 Delgaudio ら¹⁴⁾ により、SDS-PAGE (ポリアクリラミド電気泳動) 上の非定型的 MHC 蛋白のバンドが TA と後輪状披裂筋 (PCA) に発現していることが報告された。これは従来の四肢筋に見られる type I, II A, II X, II B とは異なる非典型的な MHC で、彼等はこれを喉頭特有の MHC とし、Larynx の L をとって、type II L と命名した。

このような喉頭における特有の MHC は、声門閉鎖反射のような速い運動を可能にする、superfast MHC である可能性を示唆するものである。そこで本研究では、type II L MHC が superfast MHC であるか否かを検討するため、EOM の superfast MHC を認識する抗 EOM superfast MHC 抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、さらに、superfast MHC を発現する muscle fiber の局在を探索するため、同抗体を用いた免疫組織染色を行った。

方 法

組織準備

Sprague-Dawley ラット (体重200~250g) を用い、過量のペンタバルビタールで安楽死させ、即座に喉頭を摘出

1) 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) Johns Hopkins 大学医学部耳鼻咽喉科学教室

1) Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

2) Department of Otolaryngology, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

した。SDS-PAGE およびウエスタンブロットのためには、後輪状披裂筋 (PCA), 甲状披裂筋 (TA), 声帯筋 (VOC), 外側輪状披裂筋 (LCA), 輪状甲状筋 (CT) を顕微鏡下に摘出した。免疫組織染色のためには、液体窒素により、摘出喉頭全体を OCT 中に凍結させた。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

既報告の方法を用いた¹⁵⁻¹⁷⁾。すなわち、摘出されたそれぞれの筋を各々別に、0.1M KCL, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 1mM dithiothreitol を含む buffer 中で粉碎後、遠心分離し、沈渣を 150mM tris, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol を含む pH 6.8 の buffer に溶解しサンプル溶液を作製した。次に、0.75mm 厚の 5.5% acrylamide と 35% glycerol を含む separating gel と 3% acrylamide stacking gel を用いポリアクリラミド電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を行った。泳動用 buffer には 0.3% tris, 1.44% glycerol, 0.1% SDS を用い、7 mA の定電流で 22~24 時間泳動した。泳動後の gel は銀染色 (Silver Stain Plus Kit, Biorad, Herclius, CA) にて蛋白バンドを可視化した。MHC 蛋白の相対的組成割合は銀染色後の gel を NIH Image 1.58 f を用いて densitometry を行い、求めた。

ウエスタンブロットは SDS-PAGE gel 上の MHC 蛋白バンドを 35mA の定電流、1 時間、摂氏 4 度でセミドライ型電気ブロット装置を用い、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写した。この膜を洗浄後、5% nonfat dry milk を含む TTBS 溶液 (Tween 20 in tris-buffered saline) 中で 1 時間室温でブロックし、さらに、このブロック溶液で希釈した一次抗体であるマウス抗 MHC 抗体

(4A6: anti-extraocular superfast, BF-F3: anti-rat type II B, SC-71: anti-rat type II A, BA-D5: anti-rat type I) と室温にて 2 時間反応させた。次に洗浄後、ブロック溶液で希釈した二次抗体である alkaline phosphatase 標識抗マウス Ig 抗体 (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, Alabama) と室温で 45 分反応後、alkaline phosphatase kit (Biorad) にてシグナルを検出した。

尚、使用した一次抗体 4A6 は Dr. F.Y. Hoh, University of Sydney, Australia より御好意により供与され、また BF-F3, SC-71, BA-D5 は Dr. S. Schiaffino, University of Pauda, Italy より, Regeneron Pharmaceuticals (Tarrytown, NY) を通じ、供与された。

免疫組織染色

厚さ 10~12um の新鮮凍結切片を作製後、ヤギ血清 (Biogenex, San Ramon, CA) にて 30 分間ブロックを行ない、希釈したマウス抗 MHC 抗体 (ウエスタンブロットに使用したものと同じ抗体) を一次抗体として用い、2 時間室温にて反応させた。洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗マウス Ig 抗体 (Biogenex) を用い、さらに peroxidase 標識 streptavidin (Biogenex) にて反応後、DAB kit (Vector, Burlingame, CA) にて発色させ、hematoxylin にて counterstain し、封入検鏡した¹⁵⁾。

結 果

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

図 1 に、左側に銀染色後の SDS-PAGE gel, 右側にウエスタンブロットを示す。

銀染色後の SDS-PAGE gel 上の MHC バンドの位置に

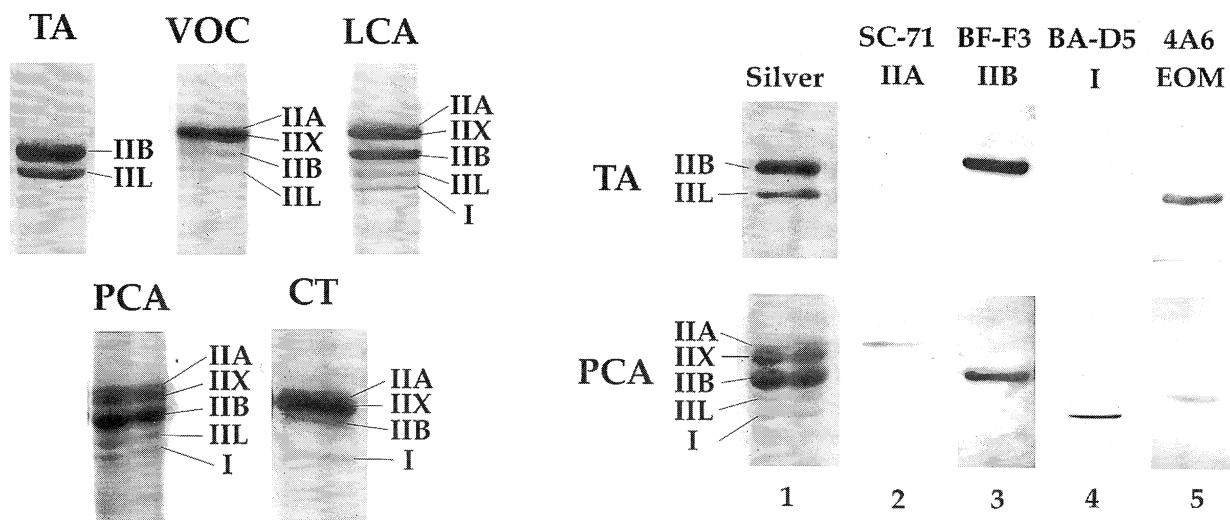


図 1 左: 銀染色後の SDS-PAGE gel それぞれの内喉頭筋における MHC type の発現を示す。
右: TA (上段) と PCA (下段) サンプルにおける銀染色された SDS-PAGE (レーン 1) とウエスタンブロット (レーン 2~5) を示す。ウエスタンブロットに用いられた抗体 (SC-71: 抗 type II A MHC 抗体, BF-F3: 抗 type II B MHC 抗体, BA-D5: 抗 type I MHC 抗体, 4A6: 抗 EOM superfast MHC 抗体) を上段に示す。各抗体の各 MHC type に対する選択的反応が見られている。

文献¹⁵⁾より転載

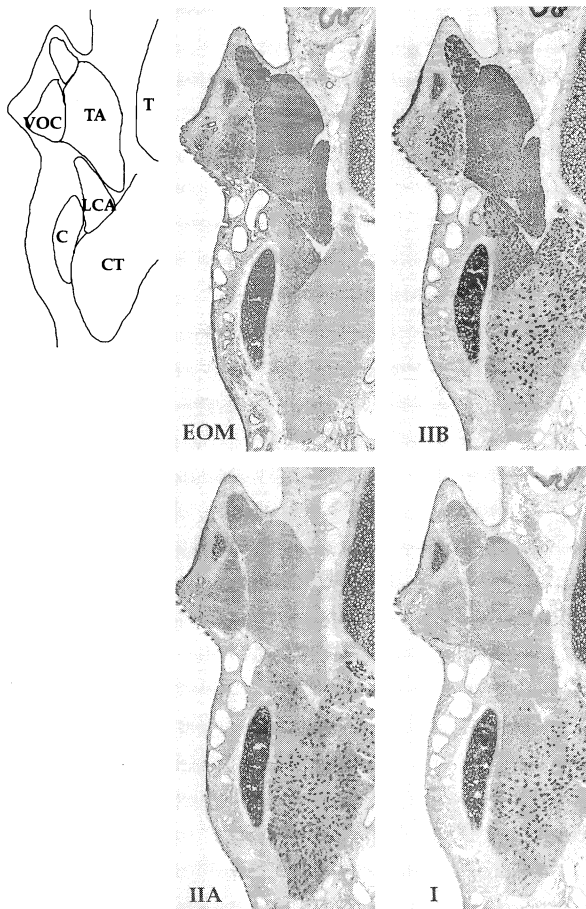


図2 各 MHC type に対する一次抗体を用いて免疫組織染色を行った半側喉頭の前額断連続切片を示す。左上の輪郭図は各筋の位置を示す (TA: 甲状披裂筋, VOC: 声帯筋, LCA: 外側輪状披裂筋, CT: 輪状甲状筋, T: 甲状軟骨, C: 輪状軟骨)。左上は抗 EOM superfast MHC 抗体, 右上は抗 type II B MHC 抗体, 左下は抗 type II A MHC 抗体, 右下は抗 type I MHC 抗体を用いて免疫染色した組織切片を示す。文献15)より転載

については、過去に報告したように¹⁵⁻¹⁷⁾、最も遅く (最も gel の上段側に) 泳動される MHC バンドは type II A で、続いて type II X, II B, II L, I である。TA では II B と II L の 2 つの MHC のみ発現しており、その内側にある VOC や同じ声帯内転筋の LCA では他の MHC type を発現していた。声帯外転筋の PCA は全ての MHC type を発現していた。唯一の上喉頭神経支配の CT は type II L MHC の発現を欠いており、II L MHC は反回神経支配筋のみに発現していた。

ウェスタンブロットでは、今回使用した各一次抗体と各 MHC バンドの反応性を確認した。代表サンプルとして TA, PCA を示す。レーン 1 は非特異的蛋白染色である銀染色、レーン 2 ~ 5 が各種 MHC 抗体を用いたウェスタン

ブロットである。SC-71, BF-F3, BA-D5 がそれぞれ選択的に type II A, II B, I のバンドと反応した。EOM に発現する superfast MHC を認識する 4A6 は選択的に type II L と反応した。以上によりラットの内喉頭筋には発現する type II L MHC は EOM に発現する superfast MHC と同一の MHC であることが示された。

表 1 に densitometry で求めた各内喉頭筋における各 MHC の相対的成分構成を示す。最大収縮速度に大きな影響を及ぼすと思われる type II L の組成については、TA は 30% 以上が superfast type である II L で、VOC, LCA, PCA では約 7 から 8 % の割合であった。CT では type II L は発現していなかった。

免疫組織染色

図 2 に弱拡大の連続切片における免疫組織染色の結果を示す。上段左が、抗 EOM superfast MHC 抗体による染色結果であるが、superfast fiber の分布状況は TA では全ての fiber が陽性、LCA, VOC では分散状に陽性であった。またここには示していないが PCA においても分散状に陽性であった。CT には陽性 fiber は見られなかった。抗 type II B 抗体による染色では、VOC, LCA, PCA, CT においては分散状に陽性であったが、TA においては全ての fiber が陽性であった。他の抗 type II A MHC や抗 type I MHC の抗体を用いた染色では、VOC, LCA, PCA, CT においては分散状に陽性であったが、TA では全ての fiber が陰性であった。したがって、TA においては、全ての fiber 内に superfast MHC と type II B MHC の 2 つの MHC が同時に発現しており、MHC の co-expression が観察された。

図 3 に、LCA における強拡大の連続切片の免疫組織染色の所見を示す。番号あるいは矢印は同じ fiber を示す。たとえば 1 番や 2 番の fiber では superfast MHC が発現しており、同時に type II B MHC も発現していた。しかし type II A や type I は発現していなかった。このように、superfast MHC の発現には、ほぼ全ての場合において type II B の発現が伴っていた。しかし、3 番の fiber のように type II B は発現しても superfast type は必ず発現しているとは限らなかった。superfast MHC と type II A や type I との co-expression は見られなかったが、極く稀に、4 番の fiber のように superfast MHC のみ陽性で他の MHC type は陰性のものも見られた。現在のところ type II X MHC に対する特異抗体が存在しないため、このような fiber においては type II X MHC と EOM superfast MHC の co-expression の可能性が否定できなかった。また、矢印の fiber のように、superfast MHC 以外の type II A と type I の co-expression も見られた。

これらの TA や LCA に見られた EOM superfast MHC と type II B MHC の co-expression の所見は PCA や VOC にも共通して観察された。

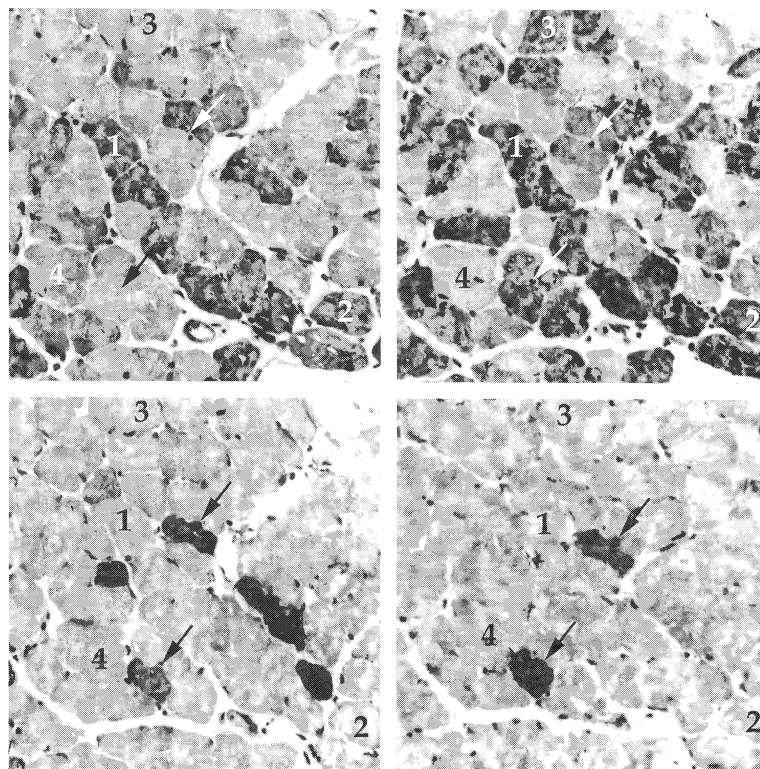


図3 強拡大のLCAにおける、各MHC typeに対する一次抗体を用いた免疫組織染色の連続切片を示す。左上は抗EOM superfast MHC抗体、右上は抗type II B MHC抗体、左下は抗type II A MHC抗体、右下は抗type I MHC抗体を用いて免疫染色した組織切片を示す。番号や矢印は連続切片上における同一のmuscle fiberを表わす。
文献15)より転載

考 察

モノクローン抗体である4A6は猫のEOMに発現するsuperfast MHCに対する抗体で、猫、兎、ラット、ヒヒ、猿のEOMのMHCと選択的に反応する^{18, 19)}。また、兎の甲状披裂筋のMHCと反応することも示されている¹⁸⁾。本研究においては、ラット喉頭に見られた非典型的MHCであるtype II L MHCと4A6が選択的に反応することが、ウエスタンブロット上で観察され、ラット内喉頭筋におけるEOM superfast MHCの発現が証明された。先に述べたように、甲状披裂筋はEOMやjaw-closing muscleに匹敵する速い最大収縮速度を持っており、内喉頭筋におけるsuperfast MHCの発現は妥当と言える。

内喉頭筋の収縮特性を観察した過去の報告^{4, 20, 21)}によれば、最大収縮速度はTAにおいて最も速く、CTにおいて最も遅く、LCAはその中間である。この順列は、本研究において観察されたII L (superfast) MHCの割合の高さの順列、TA>LCA>CT(表1)に一致し、superfast MHCの発現濃度が実際の最大収縮速度の決定に関与していると思われる。

この速い運動に深く関与すると思われるtype II L (superfast) MHCと遅く持続的な運動に深く関与すると

思われるtype I (slow) MHCの組成割合は、各内喉頭筋の機能や役割を特徴づけている。TAは最も速いtype II Lの組成割合が内喉頭筋中最も高く、さらにfast type.の中でも最も速いtype II Bとの2つのMHCのみから成り、声門閉鎖反射のような速い運動に適したMHC構成であるといえる。もうひとつの主たる声帯内転筋であるLCAは、type II L MHCはTAに比べ低く、TAには発現していないtype I MHCが発現しており、TAほど速くない運動に適したMHC構成を示し、声門閉鎖反射よりも通常の発声、嚥下等に伴う声門閉鎖に深く関与している可能性がある。VOCは、type II Lの割合はTAより低く、より遅い運動に適しているMHC構成は、声門閉鎖反射よりも発声における同筋の優位性を示すものと思われる。唯一の声帯外転筋であるPCAもTA比type II L MHCが少なく、type I MHCが多い構成となっている。これも同筋が呼吸筋としての性格が強く、持続的に働くためのMHC構成と考えられる。CTはtype II Lの発現を欠いており、またtype Iの割合は内喉頭筋中最も高く、補助的に働く呼吸筋としての性格を強く反映したものと思われる。

また、免疫染色組織所見において、type II L MHCとtype II B MHCとのco-expressionが見られた。MHCのco-expressionとは、2つ以上のMHCが1つのmuscle

表1 各内喉頭筋における MHC 組成.

	Type I	Type II A	Type II X	Type II B	Type II L
PCA	6.5%±0.7	12.0%±2.0	26.8%±2.2	46.3%±2.3	8.3%±1.2
TA	(-)	(-)	(-)	67.0%±1.2	33.0%±1.2
	Type I	Type II A + II X	Type II B	Type II L	
VOC	(-)	81.0%±3.3	10.7%±2.3	8.4%±1.6	
CT	8.6%±1.0	76.3%±3.1	15.0%±2.5	(-)	
LCA	4.4%±0.7	51.3%±4.8	37.0%±3.9	7.4%±1.5	

(N = 6, mean±SE)

文献16)より転載

fiber に発現する現象である²²⁾. この現象は, slow type と fast type の組み合わせや fast type 同志の組み合わせでも観察され²²⁾, 犬の内喉頭筋においても最近報告された²³⁾. 現在のところその生理的意義は不明であるが, superfast type である type II L MHC と fast type の中で最も速い type II B MHC の co-expression は速い運動に適応するため, 機能的に洗練された muscle fiber を作り出すための結果かもしれない.

内喉頭筋の中で唯一の上喉頭神経支配である CT における type II L MHC の発現の欠如は, 注目し値する. 他の筋は全て反回神経支配筋であり, その全てが type II L を発現していたことから, type II L の発現は神経支配により規定されているように見える. また, 反回神経支配筋は第6鰓弓由来, 上喉頭神経支配筋は第4鰓弓由来であり, 筋芽細胞の発生母地による違いとも考えられる. Hoh ら²⁴⁾ は superfast MHC を発現する猫の Jaw-closing muscle を superfast MHC を発現していない下肢の筋内に移植したが, 支配神経とは無関係に superfast MHC を発現し続けた. このことから, superfast MHC の発現は発生母地に規定されたとしたが, ラットの内喉頭筋における superfast MHC の発現を規定する因子については今後の検討を要する課題である.

ま と め

1. ラット内喉頭筋に superfast (type II L) myosin heavy chain の発現がみられ, 喉頭特有の type II L MHC は superfast type と思われた.
2. superfast myosin heavy chain は反回神経支配筋のみに発現しており, superfast myosin heavy chain の発現は神経支配あるいは発生起源により規定されていると思われた.
3. superfast myosin heavy chain の濃度は TA において最も高く, 内喉頭筋における superfast myosin heavy chain の濃度の順位は, 過去に報告されている最大収縮速度の順位に一致した.
4. superfast myosin heavy chain と type II B myosin heavy chain の co-expression が同一の muscle fiber 内でみられた.

文 献

- 1) Buller AJ et al: Differentiation of fast and slow muscles in the cat hindlimb. J Physiol (London) 150: 399~416, 1960.
- 2) Taylor A et al: Histochemical and mechanical properties of the jaw muscles of the cat. Exp Neurol 38: 99~109, 1973.
- 3) Cooper S & Eccles JC: The isometric responses of mammalian muscles. J Physiol (London) 69: 377~385, 1930.
- 4) Martensson A & Skoglund CR: Contraction properties of intrinsic laryngeal muscles. Acta Physiol Scand 60: 318~336, 1964.
- 5) Hirose H et al: An experimental study of the contraction properties of the laryngeal muscle in cat. Ann Otol Rhinol Laryngol 78: 297~306, 1969.
- 6) Reiser PJ et al: Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. J Biol Chem 260: 9077~9080, 1985.
- 7) Ranatunga KW & Thomas PE: Correlation between shortening velocity, force-velocity relation and histochemical fibre-type composition in rat muscle. J Muscle Res Cell Motil 11: 240~250, 1990.
- 8) Lännergren J: Contractile properties and myosin isozymes of various kinds of *Xenopus* twitch muscle fibres. J Muscle Res Cell Motil 8: 260~273, 1987.
- 9) Allemeier CA et al: Effects of sprint cycle training on human skeletal muscle. J Appl Physiol 77: 2385~2390, 1994.
- 10) Staron RS et al: Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. J Appl Physiol 70: 631~640, 1991.

- 11) Rowlerson A et al : A novel myosin present in cat jaw-closing muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2 : 415~438, 1982.
- 12) Sartore S et al : Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 8 : 161~172, 1987.
- 13) Schiaffino S et al : Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 10 : 197~205, 1989.
- 14) DelGaudio JM et al : Atypical myosin heavy chain in rat laryngeal muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104 : 237~245, 1995.
- 15) Shiotani A & Flint PW : Expression of extraocular-superfast-myosin heavy chain in rat laryngeal muscles. *Neuroreport* 9 : 3639~3642, 1998.
- 16) Shiotani A & Flint PW : Myosin heavy chain composition in rat laryngeal muscles after denervation. *Laryngoscope* 108 : 1225~1229, 1998.
- 17) Shiotani A et al : Developmental transition of myosin heavy chain in rat laryngeal muscles. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108 : 509~515, 1999.
- 18) Lucas CA et al : Expression of extraocular myosin heavy chain in rabbit laryngeal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 16 : 368~378, 1995.
- 19) Lucas CA & Hoh JFY : Extraocular fast myosin heavy chain expression in the levator palpebrae and retractor bulbi muscles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2817~2825, 1997.
- 20) Hall-Caggs EC : The contraction time and enzyme activity of two rabbit laryngeal muscles. *J Anat* 102 : 241~245, 1968.
- 21) Hast MH : The primate larynx. A comparative physiological study of intrinsic muscles. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 67 : 84~92, 1969.
- 22) Sant'ana Pereira JAA et al : New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *J Muscle Res Cell Motil* 16 : 21~34, 1994.
- 23) Wu YZ et al : A new concept in laryngeal muscle: Multiple myosin isoform types in single muscle fibers of lateral cricoarytenoid. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118 : 86~94, 1998.
- 24) Hoh JF & Hughes S : Expression of superfast myosin in aneural regenerates of cat jaw muscle. *Muscle Nerve* 14 : 316~325, 1991.

別刷請求先 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室
 塩谷彰浩
 e-mail : ashiotan@med.keio.ac.jp