

ラット骨格筋線維の免疫組織化学的タイプ分類

大石康晴・井福裕俊・谷口紘八・松元尚大

Immunohistochemical Classification of Fiber Types in Rat Skeletal Muscle

Yasuharu OISHI, Hirotoshi IFUKU,
Kohachi TANIGUCHI, and Hisahiro MATSUMOTO

(Received September 1, 1997)

Skeletal muscle fibers are classified into several types on the basis of their enzyme activity such as oxidative or glycolytic enzymes and myosin ATPase by enzyme-histochemistry. In the present study, we carried out the fiber typing by immunohistochemistry based on the type of myosin heavy chain (MHC) isoform, which was specifically distributed in each fiber. Six types of anti-MHC antibodies were used as follows: 1) anti-fast type MHC antibody that reacts to all fast types MHC; 2) anti-slow type I MHC antibody that reacts only to slow type I MHC; 3) anti-type IIa MHC antibody that reacts only to type IIa MHC; 4) anti-type IIb MHC antibody that reacts only to type IIb MHC; 5) anti-all type MHC except type IIx antibody that reacts to all types of MHC except type IIx, and 6) anti-type IIx+IIb MHC antibody that reacts to both types IIx and IIb MHC. The fiber containing only one type of MHC isoform: I, IIa, IIx or IIb was classified into type: I, IIA, IIX, or IIB, respectively. Some fibers contained two types of MHC isoform: IIa+IIx or IIb+IIx were classified into type: IIX or IIBX, respectively. Immunohistochemical techniques are useful to identify the MHC phenotype expressed in a fiber, and to study the changes of MHC component in the single fiber level or/and fiber type composition of the skeletal muscles.

Key Words: muscle fiber, myosin heavy chain (MHC), immunohistochemistry

1. 緒 言

私たちの身体を形成する筋肉には、心臓を形成する心筋、おもに内蔵を形成する平滑筋、そして身体運動に直接関与する骨格筋がある。骨格筋は筋線維の集合体であり、この筋線維が運動神経からの刺激を介して随意的あるいは反射的に収縮することによって、手足を動かしたり、歩行やランニングが可能となる。これまで、筋線維にはいくつかのタイプが存在することが明らかとなっており、ミオシン ATPase 活性または解糖系・酸化系酵素活性などを基にした酵素組織化学的染色により、遅筋線維 (slow-twitch fiber, ST: slow-twitch oxidative fiber, SO: type I) と速筋線維 (fast-twitch fiber, FT: fast-twitch oxidative glycolytic fiber, FOG: fast-twitch glycolytic fiber, FG: type II) に大別される。前者は収縮速度は遅いが持久能力に優れており、後者は収縮速度が速く瞬発能力に優れた特性を有している。一方、それぞれの筋線維は、そのタイプに特異的なミオシン重鎖 (myosin heavy chain, 以下 MHC と略す) から構成されている。したがって、MHC のタイプの違いにより免疫組織化学的手法により筋線維を分類することが可能であり、これまでの研究から以下の分類がなされている⁶⁾: type I MHC を含む type I 線維, type IIa MHC を含む

type IIA 線維, typeIIx MHC を含む type IIX 線維, type IIb MHC を含む type IIB 線維.

本研究は, ラット足底筋を用いて, 6 種類の抗ミオシン重鎖抗体 (anti-MHC antibody) に対する筋線維の染色反応の有無から, 免疫組織化学的に筋線維をいくつかのタイプに分類した. 単一筋線維は基本的に 1 種類の MHC を含んでいるが, 2 種類の MHC を含む筋線維も見られた.

II. 方 法

A. 実験動物

実験には, 生後 10 週齢の雄 Wistar ラットを用いた. 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $60 \pm 5\%$, 照明は 12 時間毎の明暗サイクルの状態に 1 週間の予備飼育の後, エーテル麻酔下で足底筋を摘出し, 免疫組織化学的分析に供した.

B. 免疫組織化学的染色

免疫組織化学的手法は Talmadge らの方法⁹⁾に基づいて行った. まず, 鋭利な剃刀により, 足底筋 (m. plantaris) の筋腹付近を約 5mm 取り出し, クリオスタットにより $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作成し, あらかじめゼラチンコーティングしたスライドガラスに張り付けた. 室温で 20 分程度乾燥させた後, 組織をリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline; PBS, 一次抗体が IgG の場合) またはトリス緩衝液 (Tris buffered saline; TBS, 一次抗体が IgM の場合) に約 20 分間, さらにブロッッキング溶液 (ウマまたはヤギ血清) に 15~20 分間浸した. その後, 一次抗体 (抗ミオシン

Table 1. Monoclonal antibody specificity to each type of fiber

Fiber type	Antibodies					
	fast	slow	Ila	all-x	Ilb	Ilb+Ilx
slow type						
I	—	+	—	+	—	—
fast type						
IIA	+	—	+	+	—	—
IIB	+	—	—	+	+	+
IIX	+	—	—	—	—	+

Abbreviation of antibody: fast, anti-fast MHC antibody; slow, anti-slow MHC antibody; Ila, anti-type Ila MHC antibody; all-x, anti-all types of MHC except type Ilix antibody; Ilb, anti-type Ilb MHC antibody; Ilb+Ilix, anti-types Ilb+Ilix antibody. +, positive staining; —, negative staining.

重鎖抗体)を組織上に浸し、組織が乾燥しないように保湿チャンバーに入れて冷蔵室(4°C)で一晩放置し反応させた。各緩衝液で洗浄した後、ビオチン化二次抗体(抗マウス IgG・抗マウス IgM)を組織上に浸し、1時間室温で放置する。さらに、アビジン-ビオチン溶液に1時間室温で反応させた後、一次抗体が IgG の場合はペルオキシダーゼ DAB 基質キット (Vector SK-4100) により、一次抗体が IgM の場合は BCIP/NBT (SIGMA B-6404) 溶液 (1 drop levamisole (Vector)/5ml BCIP/NBT) により発色させた。なお、ブロッキング溶液、ビオチン化二次抗体、アビジン-ビオチン溶液などはベクタステイン ABC キット (一次抗体が IgG の場合は Vector PK-6102, 一次抗体が IgM の場合は Vector AK-5010) を用いた。

C. 一次抗体

本研究では、一次抗体として以下の6種類の抗ミオシン重鎖モノクローナル抗体を用いた^{6,9)}：1) anti-fast MHC 抗体 (IgG, fast type MHC に反応), 2) anti-slow type I MHC 抗体 (IgG, slow type MHC I のみに反応), 3) anti-type IIa MHC 抗体 (IgG, MHC IIa のみに反応), 4) anti-all fibers except type IIx MHC 抗体 (IgG, MHC IIx を除くすべてのタイプの MHC と反応), 5) anti-type IIb MHC 抗体 (IgM, MHC IIb のみに反応), 6) anti-type IIx+IIb MHC 抗体 (IgM, MHC IIx と IIb に反応)。筋線維タイプ別の各抗体に対する染色応答については表1にまとめた。

III. 結 果

図1のパネルA-Gには、それぞれの抗ミオシン重鎖抗体に対する個々の筋線維の免疫組織写真を示した。各抗体に対する筋線維 No.1~5の染色反応を表2に示し(+はポジティブ染色, -はネガティブ染色), それに基づいて筋線維をタイプ分類した。筋線維 No.1~4は, fast MHC 抗体(図1, panel C)に対しポジティブ, slow MHC 抗体(図1, panel D)に対してネガティブの反応を示したことから速筋線維 (type II fiber) であることが分かる。さらに, 速筋線維をサブタイプに分類するために, IIa MHC 抗体(図1, panel E), all-x MHC 抗体(図1, panel F), IIb MHC 抗体(図1, panel B), IIb+IIx MHC 抗体(図1, panel G)との反応を検討したところ, 筋線維 No.2は上記4種類の抗体に対して, それぞれ+, +, -, -の反応を示し type IIa MHC を含む type IIA 線維に分類された(図1および表2)。同様に筋線維 No.3は, -, -, -, +の反応を示し type IIx を含む type II x 線維に分類された(図1および表2)。一方, 筋線維 No.1は IIa MHC 抗体(図1, panel E)と all-IIx MHC 抗体(図1, panel F)に対して中間的な染色反応を示し(表2では±で示した), IIb MHC 抗体(図1, panel B)にはネガティブ, IIb+IIx MHC 抗体(図1, panel G)にはポジティブな染色反応を示しており, この結果から type IIa MHC と type IIx MHC の両方を含む type AX 線維に分類された。同様な染色反応の有無の検討により, 筋線維 No.4は, type IIb MHC と type IIx MHC 両方を含む type BX 線維に分類された。筋線維 No.5は, slow MHC 抗体(図1, panel D)と all-IIx MHC 抗体(図1, panel F)に対してポジティブの反応を示したことから type I MHC を含む遅筋線維 (type I fiber) に分類された(表2)。

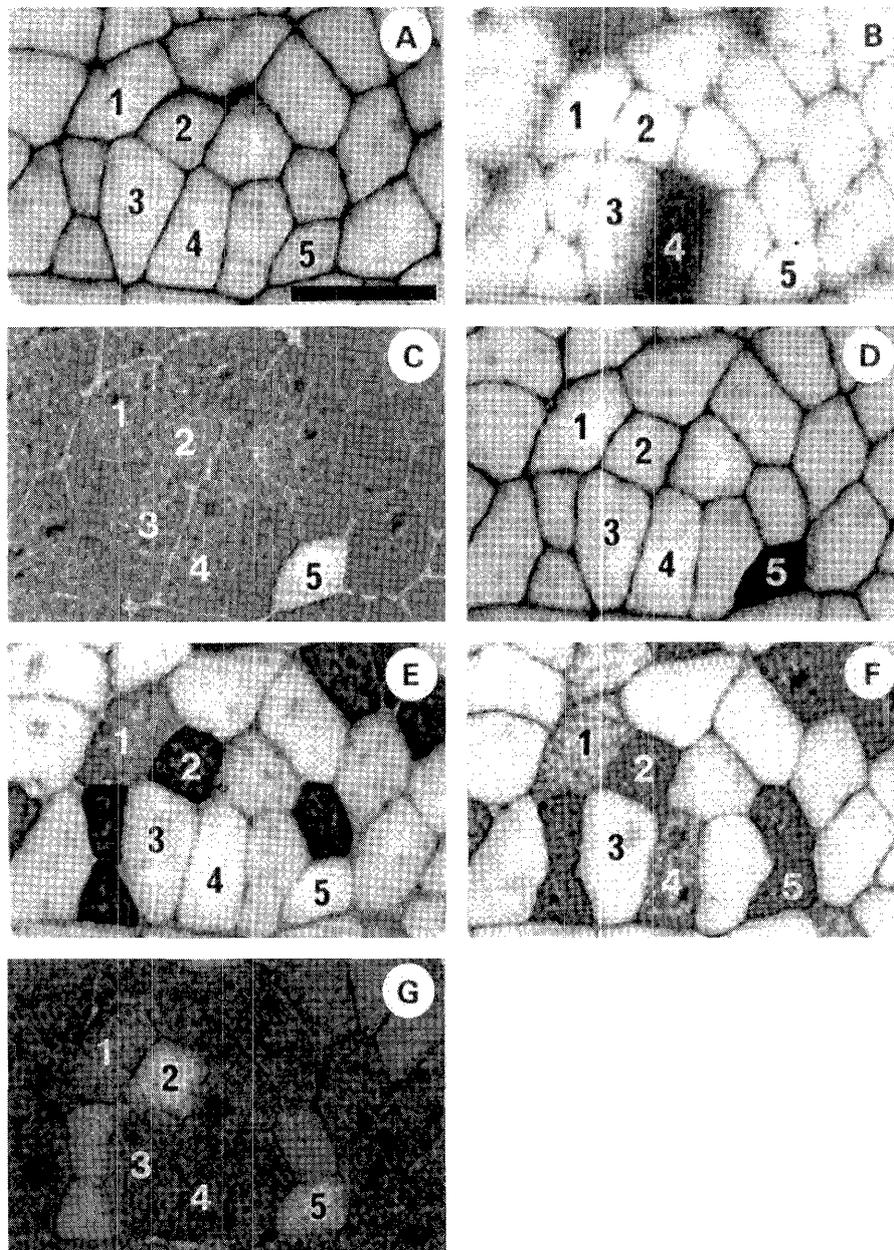


Fig. 1. Immunohistochemical staining of rat plantaris muscle by 6 types of anti-myosin heavy chain (MHC) antibodies. panel A, control, not incubate with any types of primary antibodies; panel B, anti-type IIb MHC antibody that reacts only to type IIb MHC; panel C, anti-fast type MHC antibody that reacts to all fast types MHC; panel D, anti-slow type I MHC antibody that reacts only to slow type I MHC; panel E, anti-type IIa MHC antibody that reacts only to type IIa MHC; panel F, anti-all type MHC except type IIx antibody that reacts to all types of MHC except type IIx; panel G, anti-type IIx+IIb MHC antibody that reacts to both types IIx and IIb MHC. Bar in panel A, 100 μ m.

Table 2 Immunoreactivity of each fiber to monoclonal antibodies and fiber typing

Fibers	Antibodies						Fiber type
	fast	slow	Ila	all-x	Ilb	Ilb+Ilx	
1	+	—	±	±	—	+	AX
2	+	—	+	+	—	—	A
3	+	—	—	—	—	+	X
4	+	—	—	±	+	+	BX
5	—	+	—	+	—	—	I

Abbreviation of antibody fast, anti-fast MHC antibody, slow, anti-slow MHC antibody, Ila, anti-type Ila MHC antibody, all-x, anti-all types of MHC except type Ilx antibody, Ilb, anti-type Ilb MHC antibody, Ilb+Ilx, anti-types Ilb+Ilx antibody +, positive staining, —, negative staining, ±, intermediate staining

IV 考 察

本研究で用いた免疫組織化学的染色法は、それぞれの筋線維に含まれるミオシン重鎖成分を特異的に認識する抗体を用いて、免疫応答の有無により筋線維をタイプ分類したものである。収縮蛋白質として知られるミオシン分子は、分子量 20 万の重鎖 2 個と分子量 2 万前後の軽鎖 4 個から構成されている。ミオシン重鎖は ATPase 活性を有しており⁷⁾、その活性は MHC Ilb > Ilx ≥ Ila > I の順序で高いことが明らかになっている³⁾。また、筋線維の収縮速度は、線維の ATPase 活性と比例しており、ATPase 活性の高い MHC Ilb > Ilx ≥ Ila > I の順序で収縮速度も速くなる^{1,2,4,8)}。通常、単一筋線維は 1 種類のミオシン重鎖を含んでおり、その分子種タイプによって筋線維タイプが決定される。本研究では、2 種類のミオシン重鎖を含むハイブリッドファイバー (type AX fiber, type BX fiber) がみられた。このようなハイブリッドファイバーは、ある筋線維が別のタイプに変化する移行期のものと考えられており、負荷が著しく増加あるいは減少した骨格筋で多くみられる。例えば、Talmadge らは、脊髄切断ラットのヒラメ筋⁹⁾ や後肢懸垂ラットヒラメ筋¹⁰⁾、拮抗筋切除により代償性に肥大したネコ¹¹⁾ またはラット⁵⁾ 足底筋で、2~3 種類のミオシン重鎖を含むハイブリッドファイバーが顕著に増加したことを免疫組織化学的染色法を用いて明らかにしている。これまで多用されてきた酵素組織化学的染色法と比較して、免疫組織化学的染色法は、さまざまな抗ミオシン重鎖抗体を用いることにより、このようなハイブリッドファイバーの検出や単一筋線維内のミオシン重鎖成分の変化、さらに骨格筋の筋線維組成変化などを検討する上でより

有効な手法といえる。

参考文献

- 1) Bottinelli, R., Schiaffino, S. and Reggiani, C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, (1991), **437**, 655-672.
- 2) Bottinelli, R., Betto, R., Schiaffino, S. and Reggiani, C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, (1994), **478**, 341-349.
- 3) Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C. and Stienen, G. J. M. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol.*, (1994), **481**, 663-675.
- 4) Larsson, L. and Moss, R. L. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscle. *J. Physiol.*, (1993), **472**, 595-614.
- 5) Roy, R. R., Talmadge, R. J., Fox, K., Lee, M., Ishihara, A. and Edgerton V. R. Modulation of MHC isoforms in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J. Appl. Physiol.*, (1997), **83**, 280-290.
- 6) Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K. and Lomo, T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, (1989), **10**, 197-205.
- 7) Sivaramakrishnan, M. and Burke, M. The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* (1982), **257**, 1102-1105.
- 8) Sweeney, H. L., Kushmerick, M. J., Mabuchi, K., Sreter, F. A. and Gergely, J. Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, (1988), **263**, 9034-9039.
- 9) Talmadge, R. J., Roy, R. R. and Edgerton, V. R. Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats. *J. Appl. Physiol.*, (1995), **78**, 1256-1265.
- 10) Talmadge, R. J., Roy, R. R. and Edgerton, V. R. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, (1996), **81**, 2540-2546.
- 11) Talmadge, R. J., Roy, R. R., Chalmers, G. R. and Edgerton, V. R. MHC and sarcoplasmic reticulum protein isoforms in functionally overloaded cat plantaris muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, (1996), **80**, 1296-1303.