

副腎髄質のクロマフィン細胞における 神経終末タンパク質 amphiphysin I の発現

岡 本 洋 子

キーワード：ラット副腎髄質，クロマフィン細胞，amphiphysin I，免疫組織化学

緒 言

amphiphysin (amph) I は Lichte らによってニワトリの軸索終末部で検出された128kDa のタンパク質であり¹⁾，C末端の SH 3 領域 (src homology 3) で GTPase dynamin と結合してシナプス小胞膜のクラスリン仲介エンドサイトーシス (clathrin-mediated endocytosis)²⁾に関与することで，シナプス小胞膜の回収機構に重要な役割を演じていることが報告されている^{3,4)}。最近，本教室との共同研究で Floyd ら⁵⁾は，amph I が乳癌や小細胞性肺癌などに随伴して重篤な神経症状を呈する腫瘍随伴症候群 (paraneoplastic syndrome)を引き起こす自己抗原のひとつであることを証明した。また，amph I は中枢神経系や網膜の神経細胞の軸索終末部だけでなく，肺，精巣，副腎，乳腺などの非神経組織においても発現していることが明らかになってきた⁵⁻⁸⁾。しかしながら，amph I の非神経組織内の局在等に関する形態学的解析は未だ充分進んではいない⁸⁾。

副腎髄質では，神経堤由来のクロマフィン細胞 (chromaffin cells) が中胚葉由来の副腎皮質原基細胞集団の内側へ侵入し，髄質を形成する⁹⁾。ラットで

は胎生12日目 (E12) の副腎原基に幼若なクロマフィン細胞が見られ，電顕による分泌顆粒の所見からノルアドレナリン (NA) のみを産生していることが報告されている¹⁰⁾。出生前後の数日間は同一細胞内で NA とアドレナリン (A) の合成がみられ¹¹⁻¹³⁾，その後，両者は別々のクロマフィン細胞で合成・貯蔵・分泌されるようになる。また，副腎クロマフィン細胞のフリーズエッチング像で，シナプス前膜表面にみられるシナプス小胞膜と細胞膜との融合像^{14,15)}と同様の像が認められており¹⁶⁾，カテコルアミンの分泌様式が分泌小胞膜の開口放出であることが示され，副腎髄質細胞でも何らかの小胞膜回収機構が働いていると推定される。

今回，副腎髄質細胞の NA 細胞と A 細胞における amph I 発現状態の相違と，副腎髄質形成期におけるクロマフィン細胞での amph I の発現動態を免疫組織化学的に検索した。

材 料 と 方 法

本観察には Wistar 系ラット胎児および新生仔を使用した。交配後，膣栓あるいは膣内に精子を確認できた日を妊娠1日目 (E1)，出生日を P0 とした。E16に子宮より摘出した胎児は，実体顕微鏡下で副腎を摘出し，直ちに4% paraformaldehyde (PA) 含有0.1Mリン酸緩衝液 (PB, pH7.4) に入れて24時間 (4℃) 浸潤固定した。E19以降の胎児および生後のラットは心臓左心室より生食水10mlを灌流して

(平成13年5月29日受理)
指導：徳永 叙教授 (脳神経制御学講座 神経機能構造学)
連絡先：筒井公子
岡山大学大学院医歯学総合研究科
脳神経制御学講座 神経機能構造学 (内線：7097)

駆血後、続けて4% PA 含有 PB (4℃) 150–200 mlを30分間以上かけて灌流し全身を固定した。灌流固定後、副腎を取り出し二分割後、新しい4% PA 含有 PB (4℃) で更に5時間後固定した。その後、副腎は20%ショ糖添加 PB (pH7.4, 4℃) に2–3日間浸漬して凍結による組織、細胞の破壊を防止し、クリオスタットによる厚さ10–12 μ mの凍結切片を作成し、シラン被覆したスライドガラスに貼付した。切片を正常血清で30分間ブロッキングした後、抗 amphiphysin (amph) I 抗体 (ヒト由来, 3.5 μ g/ml) を12時間 (室温) で作用させた。amph I に対する抗体は、乳癌に伴い paraneoplastic sensory neuropathy を示した患者血清中の自己抗体をカラムに protein G sepharose を充填したアフィニティ クロマトグラフィーキット (MAb Trap G II, Pharmacia Biotech 社) を用いて IgG に精製して使用した。なお、本抗体の amph I に対する高い特異性は Floyd らにより報告されている⁵⁾。切片は0.3% triton X と0.85%食塩添加 PB (PBS-Tx) で洗った後、ABC法 (avidin-biotin-peroxidase complex kit, Vector 社) による免疫組織化学反応を施し、0.05% DAB (3, 3'-diaminobenzidine) と0.03% H₂O₂で発色させた (ABC-DAB法)。必要に応じ、ヘマトキシリンによる後染色を施し細胞核の染色性を確認した。

また、Zamboni 液で灌流固定した正常成体ラット副腎のクリオスタット連続切片を用いて、連続する切片にそれぞれ抗 amph I 抗体と抗 dynamin 抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) を用いて上述の ABC-DAB 法で免疫染色し、同一細胞集団内に amph I と dynamin が共存するか否かを調べた。

アミン含有細胞の蛍光組織化学同定法¹⁷⁾により、動物を Faglu 固定液 (0.01% glutaraldehyde と4% PA 混合リン酸緩衝液; 0.1M, pH7.3) で浸潤固定 (E16) ないし灌流固定 (E19以降) した後、摘出した副腎を前述同様10–12 μ m厚凍結切片とした。切片をグリセリンと PBS の等量稀釈液で封入し、蛍光顕微鏡で観察、撮影した。その後、切片を PBS で

充分洗浄し、抗 amph I 抗体を用いた ABC-DAB 法で標識し、封入後、透過光による観察、撮影を行い、蛍光顕微鏡観察による同一切片の画像と比較して二重標識の有無を検討した。

4% PA-PB で固定した E16 と P0 の副腎凍結切片を、抗 dopamine- β -hydroxylase (DBH) 抗体 (ウサギ由来, Eugen Tech. Internat. 社) と抗 amph I 抗体 (ヒト由来) を用いて間接蛍光抗体法で二重標識した。

各発生段階の副腎凍結切片から、ヘマトキシリン-エオシン (Hx-E) 染色標本を作製した。

結 果

正常ラット副腎髄質の発生：

妊娠16日目 (E16) ラットの副腎原基の Hx-E 染色標本では、大部分が将来皮質となる10 $\times$ 10 μ m大のエオシン好性の細胞質をもつ多角形細胞 (cpr) で占められており、これらは不規則な細胞列あるいは細胞集団を構成していた (Fig. 1-A)。細胞核は円形でヘマトキシリン (Hx) に淡く染まっていた。副腎皮質原基の表面近くでは cpr が比較的密に分布していたが、その配列は不規則で球状帯形成はみられなかった。cpr 集団内には、細胞質が塩基好性に淡く染まる5 $\times$ 5–5 $\times$ 3 μ m位の大きさの多角形ないし楕円形の細胞 (chc) が、小さな集団を形成して島状に散在していた (Fig. 1-A)。chc の細胞質は塩基好性で、細胞核は Hx に濃染するので、cpr とは明瞭に区別できた。

E19の cpr では、表層部の細胞が球状帯を形成し始めていたが、深部の細胞集団は E16同様、配列が不規則で束状帯や網状帯の形成は未だ認められなかった (Fig. 1-B)。一方、chc は細胞体の大きさがやや増し、塩基好性の細胞質は一様に染まっていた。小さな島状の細胞集団はその数も増え、周囲に毛細血管が多く認められた。

出生時 (P0) の皮質原基では、cpr 集団内の層形成が進んでいるが、束状帯はまだ薄く球状帯近くでのみ索状配列をとっていた。cpr の細胞集団の中心部では、chc の島状集団が大きくまとまりはじめ

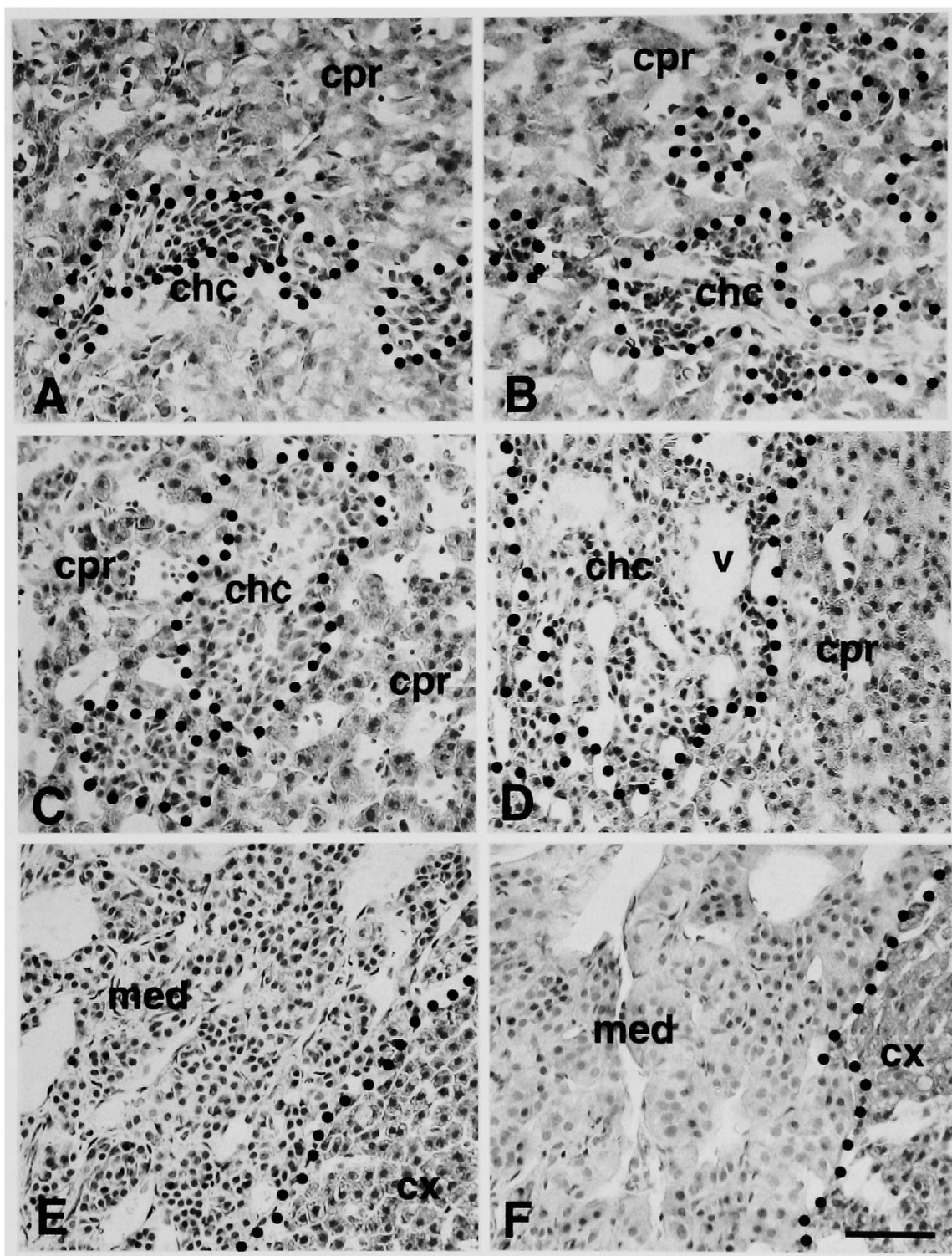


Fig. 1 Photomicrographs showing the developing rat adrenal medulla. A: E16, B: E19, C: P0, D: P2, E: P11 and F: P90. Hematoxylin-eosin staining. Bar indicates $50\mu\text{m}$. Medullary chromaffin cell groups are encircled by dots in A-D. Abbreviations: chc: chromaffin cells, cpr: cortical premordial cells, cx: adrenal cortex, med: adrenal medulla., v: blood vessel.

ており (Fig. 1-C), その塩基好性の細胞質は微細顆粒状に染まっていた。

P 2 では, 皮質原基は 3 層構造を形成し, その深部に chc が毛細血管や神経線維束をとめない, 髓質と呼べる大きな細胞集団として認められた (Fig. 1-D)。

P 11 では, 3 層構造の皮質 (cx) とその深部の髓質 (med) とが明確に区分される成体副腎 (Fig. 1-F) と同じ構成を示した (Fig. 1-E)。髓質の chc は $10 \times 10 \mu\text{m}$ の大きさの多角形細胞で細胞質は淡く塩基好性に染まり微細顆粒状を呈し, 細胞核は $3-4 \mu\text{m}$ 径で Hx に濃染していた。また, chc 集団の間には chc より大型 ($10-15 \mu\text{m}$) の多極性細胞が 1-7 個程度の集団を形成しているのが散見された。その細胞質はエオシン好性で細胞核は $10 \mu\text{m}$ と大きく Hx に淡く染まっていた。この細胞集団の周囲やその近傍には神経線維が多く認められた。

副腎髓質における amphiphysin I の発現:

成体ラット (Fig. 2): 副腎被膜ならびに球状帯, 束状帯および網状帯を構成する皮質細胞は抗 amph I 抗体で免疫染色されなかった (Fig. 2, cx)。髓質細胞の細胞質が amph I に対し免疫染色性を示したが, その染色性の強さは 3 段階 [非常に強い, 中等度の強さおよび弱い] (それぞれ Fig. 2-B の矢頭, Fig. 2-A の矢印および * 印) に区別された。非常に強い免疫染色性を示したものは, 少数であるが大型 ($20-18 \mu\text{m}$ 径) 多極性の細胞体を持ち, 単独あるいは 5-7 個程度の小集団を形成して髓質内に散在していた (Fig. 2-B)。これらの細胞の amph I に対する免疫反応は細胞質内に均等に認められたが, 細胞核は免疫反応陰性で $10 \mu\text{m}$ 径の大型円形を呈し核小体が明瞭に認められた。また, 髓質細胞周囲には非常に強く免疫染色性を示す神経線維終末が多く認められた (Fig. 2-C, 矢頭)。抗 amph I 抗体に対し中等度の強さの免疫染色性を示した細胞は $10 \mu\text{m}$ 大の多角形細胞で, $20-100$ 個程度の細胞が集まって不規則な島状細胞集団をつくり髓質内に分布していた (Fig. 2-A, 矢印)。残りの多数の細胞集団は抗

amph I 抗体に対する免疫染色性は非常に低かった (Fig. 2-A, *)。これらの細胞の形状や大きさは, 中等度の強さの免疫染色性を示した細胞と同じであり, 免疫反応も細胞質内に均一にみられ, 細胞核には反応は全く認められなかった。

連続切片による amph I と dynamin の同一細胞集団内共存の有無を調べたところ, 髓質細胞の内, amph I で中等度の強さの免疫染色性を示した細胞 (Fig. 2-A, 矢印) は, dynamin に対して強い免疫染色性を (Fig. 2-D, 矢印), amph I に弱い免疫染色性を示した細胞 (Fig. 2-A, *) は, dynamin に対してほとんど免疫染色性を示さない (Fig. 2-D, *) ことが判明した。また, amph I に対して非常に強い免疫染色性を示した細胞やその周囲の神経線維は dynamin に対する染色性を殆ど示さなかった (Fig. 2-E, 矢頭, Fig. 2-F)。

グルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒド混合固定液 (Faglu) によるアミン含有細胞の蛍光組織化学的同定 (Fig. 2-G) と免疫組織化学法による amph I の免疫反応 (Fig. 2-H) を同一切片上で行って観察すると, 蛍光が認められたノルアドレナリン産生細胞集団 (Fig. 2-G, na) が, 抗 amph I 抗体に対し中等度の強さの免疫反応を示した (Fig. 2-H, **)。一方, 蛍光が殆ど認められないアドレナリン産生細胞は抗 amph I 抗体に対し弱い免疫反応を示すことが判明した (Fig. 2-G, a, Fig. 2-H, *)。

胎児期及び新生児ラット (Fig. 3-4):

E 16 の副腎原基では, 小さな島状細胞集団が抗 amph I 抗体に対し免疫染色されたが, その染色性は弱かった。また, Hx 後染色標本により陽性反応を示した細胞は, 細胞核が濃染し細胞質が一様に塩基好性に染まる chc であり, amph I に対する免疫反応が陰性の細胞は cpr であることが確認された (Fig. 3-A)。E 19 (Fig. 3-C), P 0 (Fig. 3-E) および P 2 (Fig. 4-A) での chc の抗 amph I 抗体に対する免疫染色性は, E 16 (Fig. 3-A) と比べて大きな変化はみられなかったが, P 11 の髓質 (Fig. 4-

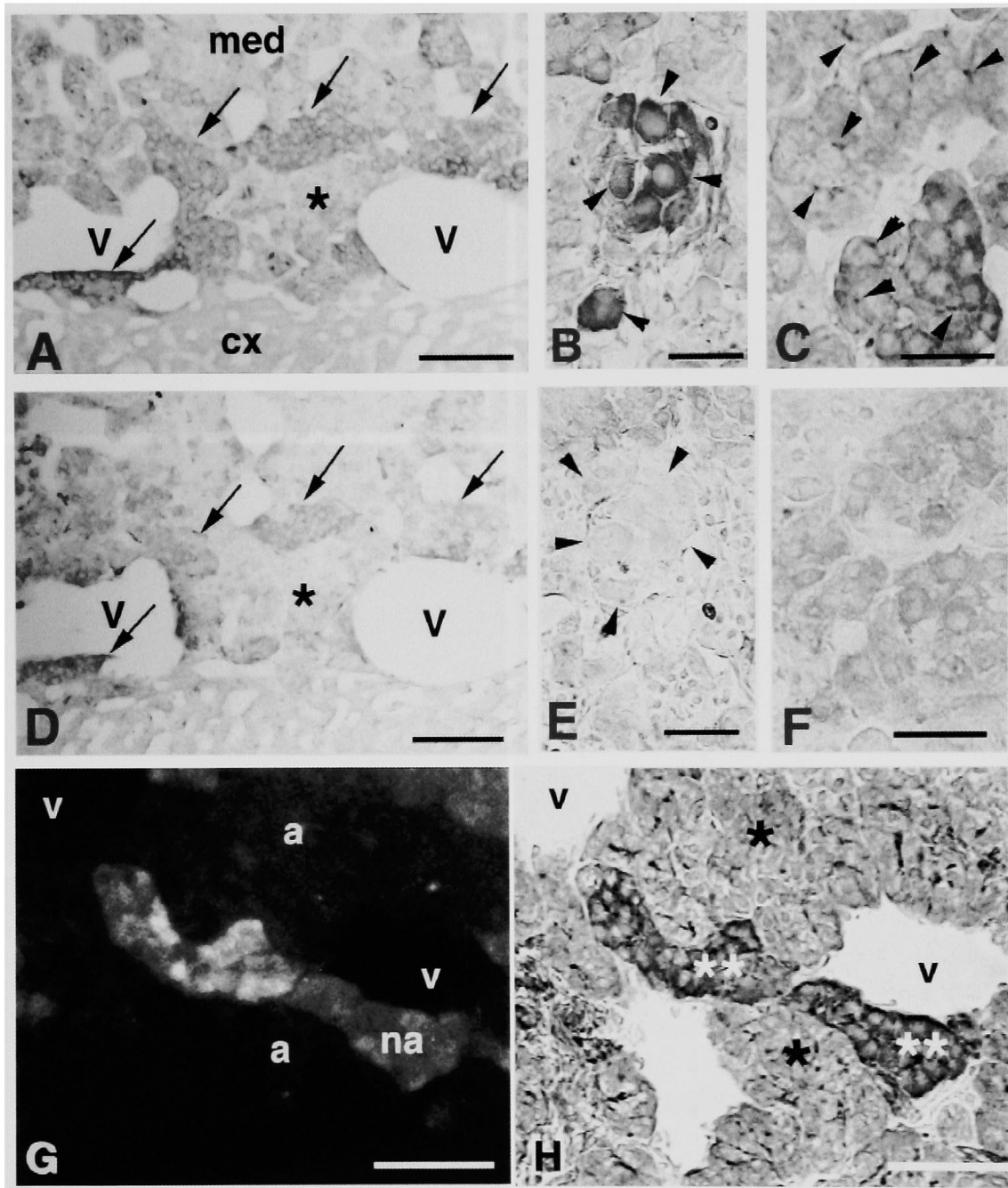


Fig. 2 A-F: Consecutive sections through the adult adrenal medulla immunostained with anti-amphiphysin (amph) I (A-C) and anti-dynamin antibodies (D-F). Cell groups with intermediately (arrows in A) and weakly (*) (A) immunoreactive to amph I are immuno-positive (arrows in D) and -negative (*) (D) to anti-dynamin antibody, respectively. Intramedullary neuronal cell bodies (arrowheads in B) and their nerve terminals (arrowheads in C) are very strongly immunoreactive to amph I but not to dynamin (E and F). G and H: Consecutive demonstration of noradrenalin (na)- and adrenalin (a)-storing cell groups by histofluorescence (G) and amph I-immunoreactivity (H) in the same section of the adult adrenal medulla. Noradrenalin-cell groups are strongly immunoreactive to amph I, while a-cell groups show the weak immunoreactivity. Bars in A and D, B and E, C and F, and G and H represent 100, 20, 50 and 100 μ m, respectively.

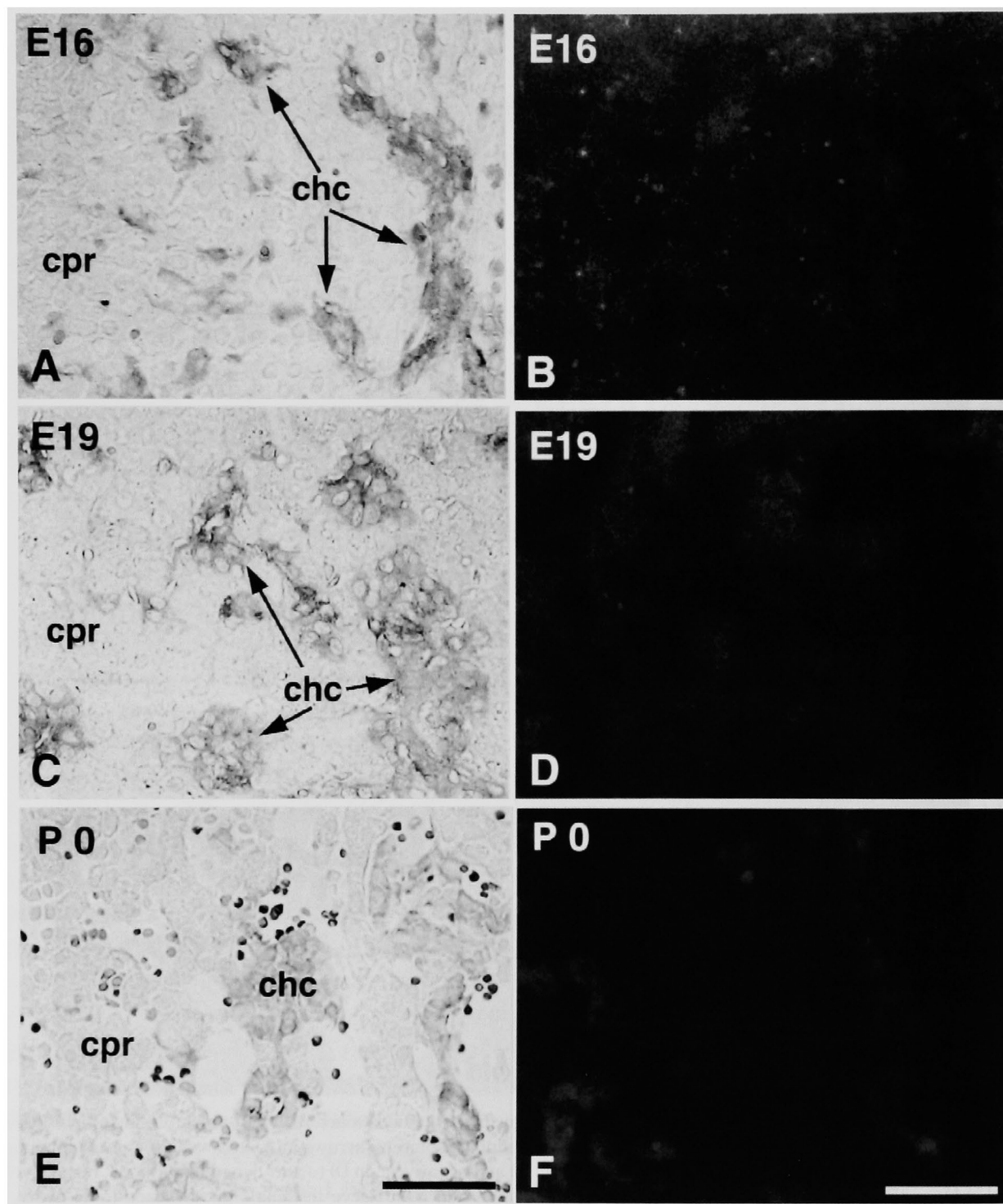


Fig. 3 and Fig. 4 Consecutive demonstration of catecholamine histofluorescence and immunoreactivity for amphiphysin I in the same section through the developing adrenal medulla. Fig. 3: E16 (A, B), E19 (C, D) and P0 (E, F).

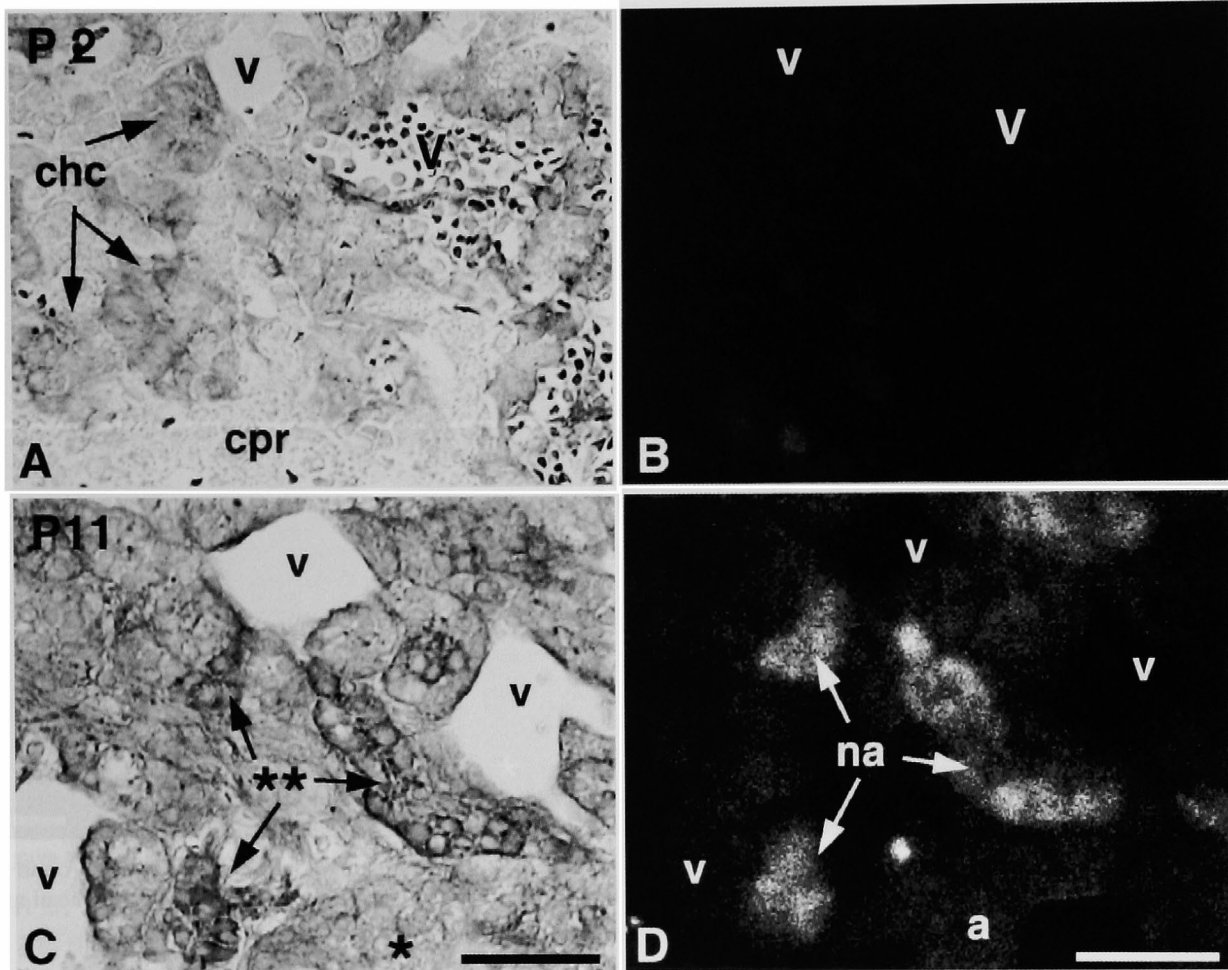


Fig. 4: P2 (A, B) and P11 (C, D). Bars indicate 50 μ m.

C) では強く免疫染色される島状細胞集団 (Fig. 4-C, **) 以外のクロマフィン細胞集団は弱い免疫反応を示し (Fig. 4-C, *), 成体の副腎髄質クロマフィン細胞の amph I に対する免疫染色パターン (Fig. 2-H) と同じであった。

Faglu 固定の E16, E19, P0, P2 および P11 副腎の chc を同一切片上で蛍光組織化学的同定法と免疫組織化学法で観察すると, E16 から P2 までは蛍光を発する細胞は殆ど認められなかった (Fig. 3 B-D, Fig. 4-B) が, P11 (Fig. 4-D) では蛍光を発している細胞集団と蛍光のみられない細胞集団が認められ, 前者は amph I に対し中等度の強さの免疫染色性を示した (Fig. 4-C, **). このことから, P11 では成体副腎同様, 抗 amph I 抗体に比較的強

く反応する chc (Fig. 4-C, **) はノルアドレナリン産生細胞 (Fig. 4-D, na), amph I に対し弱い反応を示す chc (Fig. 4-C, *) はアドレナリン産生細胞 (Fig. 4-D, a) であることが判明した。蛍光組織化学法の感度が必ずしも高くないので, chc を抗 DBH 抗体 (ウサギ由来) と抗 amph I 抗体 (ヒト由来) を用いて間接蛍光抗体法で二重標識し, E16 (Fig. 5-A, B) と P0 (Fig. 5-C, D) の amph I に対する免疫組織化学反応陽性の chc 集団にカテコラミンが発現しているか否かを検索した。その結果, E16 および P0 でごく少数の細胞で二重標識されないものが認められたが (Fig. 5, 矢頭, 矢印および*), 抗 amph I 抗体に強く反応する chc 集団の大部分が抗 DBH 抗体に対しても強い免疫染色性

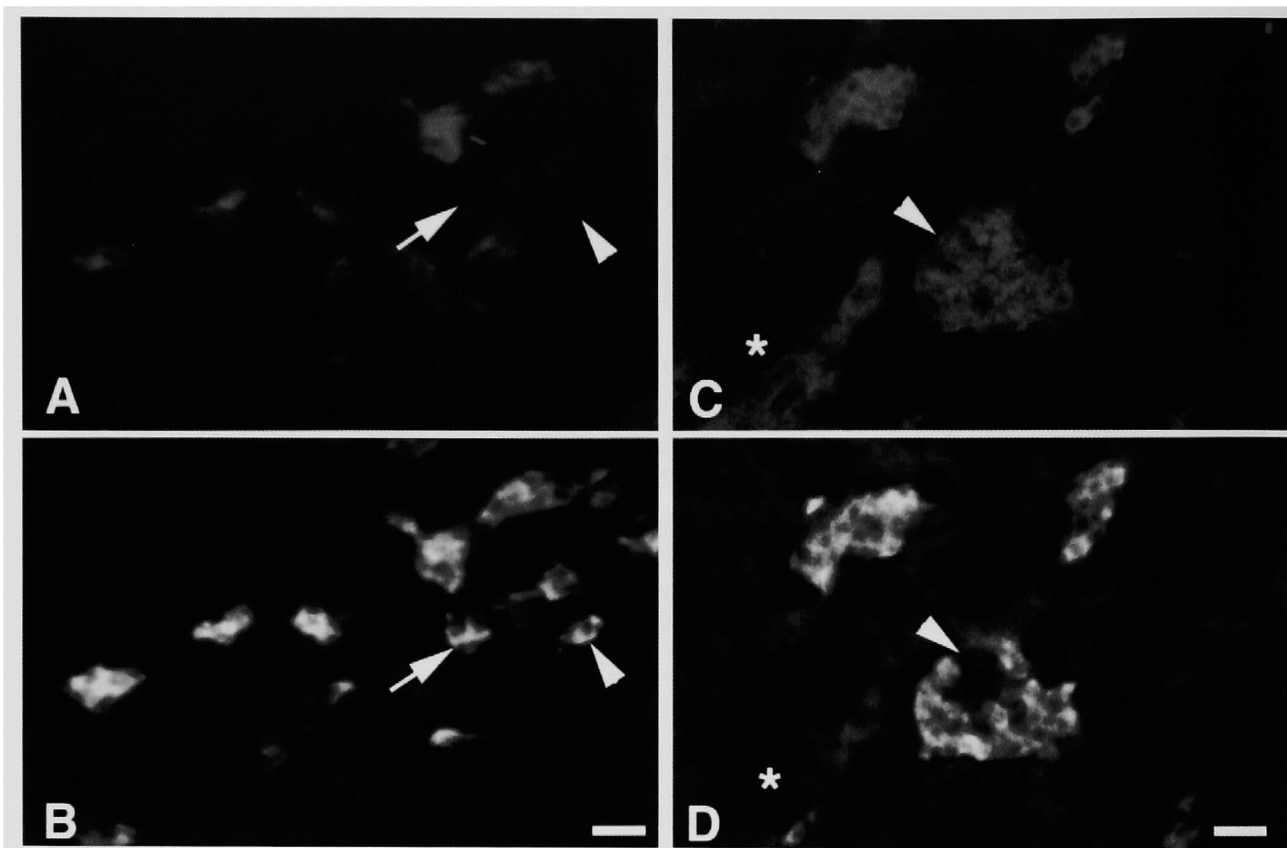


Fig. 5 Colocalization of amphipysin I (A and C) and DBH (B and D) in the developing adrenal medulla cells. A and B: E16, C and D: P0. Arrowhead and arrow in A and B: Amph I negative but DBH positive cells. Arrowhead and * in C and D: Amph I positive but DBH negative cells. Bars indicate 20 μ m.

を示すことが判明した。

考 察

amph I はニューロンの軸索終末部に発現するタンパク質¹⁾で, dynamin と結合するとともに, clathrin 被覆小胞の構成タンパクである clathrin adaptor AP2 adaptin と結合する^{3,4)}. amph I は, 細胞膜より clathrin 被覆小胞を切り離す働きを持つ dynamin^{18,19)}を被覆小胞周辺に補充することでシナプス膜の回収機構に重要な働きを演じているとされている⁴⁾. クロマフィン細胞や PC12細胞での amph I の発現^{1,6)}, さらに clathrin や dynamin の副腎髄質細胞での存在²⁰⁻²²⁾から, これらのタンパク質が, 髄質クロマフィン細胞から開口放出によるカテコラミンの分泌後, 小胞膜の endocytosis に関与する可

能性が高い。

今回, 我々は抗 amph I 特異抗体を用いて, 副腎髄質細胞が3段階(強, 中等度, 弱)の免疫染色性を示すことを見いだした. 強い免疫染色性を示したものは Hx-E 標本にみられた大型多極性細胞に相当し髄質内ニューロンであった. クロマフィン細胞には免疫染色性が中等度の強さのものと弱いものとが区別され, 前者は20-100個程度の細胞が島状集団を形成して免疫染色性の低い細胞集団の間に分布していた. さらに, Faglu 液で固定した髄質細胞の蛍光観察により, amph I に対し中等度の免疫染色性を示したクロマフィン細胞がノルアドレナリン (NA) 細胞^{17,23)}であり, 免疫染色性の低いものがアドレナリン (A) 細胞である^{17,23)}ことが判明した.

副腎の形成過程における amph I の発現動態を胎

生16日目 (E16) から生後11日目 (P11) まで調べたところ、E16で副腎皮質細胞を形成する細胞集団に入り込んだクロマフィン細胞に amph I の弱い発現がすでに認められた。P2で免疫染色性が強くなり、成体副腎髄質とほぼ同じ組織構造をとるようになるP11では、中等度の強さの免疫染色性と弱い免疫染色性を示す二種のクロマフィン細胞集団が明瞭に認められた。カテコラミン合成酵素の内、ドパミンを NA に変換する DBH に対する特異抗体をもちいて、E16およびP0の髄質クロマフィン細胞を免疫染色したところ、すでにE16でDBHに対する免疫組織化学反応が弱いながらも認められ、この時期のクロマフィン細胞でNAの合成が行われていることが示唆された。これはカテコラミン合成酵素の内、TH (tyrosine hydroxylase) と DBH は E14²⁴⁾あるいはE15²⁵⁾から発現するという免疫組織化学的所見やE15で最初の顆粒含有細胞を認めた電子顕微鏡観察所見²⁶⁾とよく一致した。E16で amph I の発現が弱いながらも認められたことは、モノアミンの合成だけでなく、分泌とそれに伴う細胞膜からの小胞膜の回収機構も作動し始めている可能性が考えられる。髄質クロマフィン細胞でAが合成されはじめる時期はE17以降^{24,25)}とされているが、電子顕微鏡による分泌顆粒の形状からは、この時期の前後数日間 (E16-E18) は電子密度の高い分泌顆粒と低い分泌顆粒の二種が同一細胞に混在することが知られている^{10,27)}。報告者により多少の时期的なずれはあるものの、E17からP2までの髄質クロマフィン細胞で、免疫組織化学的に同一細胞内に DBH と NA を A に変換する酵素である PNMT (phenylethanolamine N-methyl transferase) とが共存する、つまり NA と A の混在が報告されている^{9,12,24,27,28)}。今回、amph I に対して弱い免疫反応を示したE19、P0およびP2のクロマフィン細胞は、あまり感度の高くないモノアミンに対する蛍光組織化学法では陰性であったが、DBH や PNMT に対する抗体による免疫染色で二重標識すれば、E19、P0およびP2のクロマフィン細胞の同一細胞内に NA (P0でDBHの発現を認めた) と A との混在が認められると考えら

れる。副腎髄質細胞に NA 細胞と A 細胞とが区別されるようになるのは、電顕による分泌顆粒の電子密度や形状の違い¹⁰⁾、さらに免疫組織化学^{9,12)}から、P4以降であるとされている。今回、P11で髄質クロマフィン細胞集団を蛍光組織化学法で観察して、蛍光を発する細胞 (NA細胞) と発しないもの (A細胞) とを確認したが、amph I に対する免疫染色性は前者が高く、後者は極めて低いことが判明した。

Holgertら²⁹⁾は、ラット副腎のDBH mRNA量はP0-P4まではE21の3.5-4倍程度に増え、その後さらに著明に増加し成熟副腎では5.7倍に増えるが、PNMT mRNAはP4までは胎児期と変わらずP4以降に増加するがその増加量はE21の時の2倍程度にとどまるとしている。amph I に対する免疫染色性は、NA合成の始まった胎生期クロマフィン細胞に弱いながらみられ、生後、NA細胞で増強した。一方、A細胞に関しては amph I の発現は極めて弱く、カテコラミン含有量と amph I 発現との間には正の相関があるように思われた。さらに、カテコラミン分泌を行っている成熟副腎細胞の内、A細胞での amph I の発現が NA 細胞のそれに比して著しく弱いのは、分泌後の小胞膜回収機構に両細胞間で違いがある可能性も考えられる。Artalejo et al.^{21,30)}は副腎クロマフィン細胞で、細胞内への Ca^{2+} 流入を必要とし、GTP hydroxylase 依存性で dynamin を必要とするが clathrin は必要としない rapid endocytosis (RE) を報告している。ニューロン等でみられる clathrin 被覆小胞による受容体仲介 endocytosis とは異なる膜回収機構がクロマフィン細胞に存在する興味深い報告であるが、彼らの所見が NA 細胞と A 細胞の内のどちらでの機能解析によるものなのかは不明である。ほ乳類の dynamin には、神経組織にみられる I 型、広範な組織に分布している II 型および主として精巣に発現する III 型の存在が知られている³⁰⁾。Artalejo et al.³¹⁾は、RE には dynamin I が、受容体仲介 endocytosis には dynamin II がそれぞれ関与するとしているが、dynamin I は受容体仲介 endocytosis³²⁾に、dynamin II は Golgi 装置での分泌小胞形成とその放出に関与する³³⁾という報告

もあり、なお検討の余地がある。一方、amphiphysin に関しては1997年に amph I の他に、より広範な組織に発現する amph II が報告され³⁴⁻³⁷⁾、しかも組織特異的な amph II の splice variants も同定されており³⁷⁾、amph I と II は種々の組織で細胞の種類ごとに固有な endocytosis の機構に重要な役割を担っている可能性がある³⁸⁾。今後、副腎髄質 NA 細胞と A 細胞を含めた各種の内分泌細胞における小胞膜回収機構を理解する上で、amph I と amph II, dynamin I と dynamin II といった各 isoform の発現量、発現時期、細胞内局在などの相違を詳細に検索する必要がある。

結 論

1. 成熟ラット副腎髄質細胞では、amphiphysin (amph) I に対して中等度の強さの免疫染色性を示す細胞と弱い免疫染色性を示す細胞とが認められた。
Faglu 液で固定した髄質アミン含有細胞の蛍光組織化学法により、前者はノルアドレナリン (NA) 細胞、後者はアドレナリン (A) 細胞にそれぞれ一致した、amph I に対し強い免疫染色性を示したのは、髄質内ニューロンであった。
2. 胎児期および新生仔ラット副腎では、E 16, E 19, P 0 および P 2 のクロマフィン細胞で amph I に対し弱い免疫染色性を示した。E 16 と P 0 のクロマフィン細胞は DBH 陽性であり、NA の合成が行われていると考えられた。組織構造が成熟副腎のそれとほぼ同じとなる P 11 では、amph I に対して強弱二種の免疫染色性を示す細胞集団が認められ、強い反応がみられた髄質細胞が NA 細胞、弱いものが A 細胞であった。
3. amph I に対して中等度の強さの免疫染色性を示した NA 細胞は dynamin に対しても陽性反応を示した。一方、amph I に対する免疫染色性が弱い A 細胞は dynamin に殆んど免疫反応を示さなかった。こうした免疫染色性の差は、カテコラミンの開口分泌後に起こる小胞膜の回収機構に NA 細胞と A 細胞とでは何らかの違いがあることを思

わせた。

謝 辞

ご指導を賜りました解剖学第三講座、徳永 叙教授ならびに筒井公子助教授に心から御礼申し上げます。標本作製にあたり有益な助言と援助をいただいた細谷 修助手および技術補佐員、岩田玲子氏に深謝いたします。本研究は第105回日本解剖学会総会全国学術集会 (2000) で発表した。

文 献

- 1) Lichte B, Veh RW, Meyer HE and Kilimann MW : Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J* (1992) **11**, 2521-2530. [EMBO J (1992) **11**, p3809に訂正箇所掲載]
- 2) Brodin L, Loew P And Shupliakov O : Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* (2000) **10**, 312-320.
- 3) David C, McPherson PS, Mundigl O and De Camilli P : A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) **93**, 331-335.
- 4) Marsh M and McMahon HT : The structural era of endocytosis. *Science* (1999) **285**, 215-220.
- 5) Floyd S, Butler MH, Cremona O David C, Freyberg Z, Zhang X, Solimena M, Tokunaga A, Ishizu H, Tsutsui K and De Camilli P : Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Mol Med* (1998) **4**, 29-39.
- 6) De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck H-M, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G, Bates D, Cartledge N, Solimena M and Kilimann MW : The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Striff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* (1993) **178**, 2219-2223.
- 7) Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I and McPherson PS : Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoforms. *J Biol chem* (1997) **272**, 16700-16706.
- 8) 渡部昌実 : 神経終末タンパク質 Amphiphysin I のヒト精巣における発現. *日本不妊学会雑誌* (2000) **45**, 119-125.
- 9) Coupland RE : The natural history of the chromaffin

- cells. Twenty-five years on the beginning. Arch Histol Cytol (1989) **52** Suppl., 331–341.
- 10) Elfvin, L-G : The development of the secretory granules in the rat adrenal medulla. J Ultrastr Res (1967) **17**, 45–62.
 - 11) EI-Maghraby M and Lever JD : Typification and differentiation of medullary cells in the developing rat adrenal. A histochemical and electron microscopic study. J Anat (1980) **131**, 103–120.
 - 12) Verhofstad AAJ, Coupland RE, Parker TR and Goldstein M : Immunohistochemical and biochemical study on the development of the noradrenalin- and adrenalin-storing cells of the adrenal medulla of the rat. Cell Tissue Res (1985) **242**, 233–243.
 - 13) Coupland RE and Tomlinson A : The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat *in vivo*. A descriptive and quantitative study. Int J Devl Neurosci (1989) **7**, 419–438.
 - 14) Tokunaga A Sandri C and Akert K : Ultrastructural effects of 4-aminopyridine on the presynaptic membrane in the rat spinal cord. Brain Res (1979) **163**, 1–8.
 - 15) Tokunaga A, Sandri C and Akert K : Increase of large intramembranous particles in the presynaptic active zone after administration of 4-aminopyridine. Brain Res (1979) **174**, 207–219.
 - 16) Smith U, Smith DS, Winkler H and Ryan JW : Exocytosis in the adrenal medulla demonstrated by freeze-etching. Science (1973) **179**, 79–82.
 - 17) Furness JB, Costa M and Wilson AJ : Water stable fluorophores, produced by reaction with aldehyde solutions, for histochemical localization of catechol- and indolethylamines. Histochem (1977) **52**, 159–170.
 - 18) Takei K, McPherson PS, Schmid SL and De Camilli P : Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. Nature (1995) **374**, 186–190.
 - 19) Liu J-P and Robinson PJ : Dynamin and endocytosis. Endocr Rev (1995) **16**, 590–607.
 - 20) Hou X-E and Dahlstroem A : Synaptic vesicle proteins in cells of the sympathoadrenal lineage. J Auton Nerv Syst (1996) **61**, 301–312.
 - 21) Artalejo CR, Lemmon MA, Schlessinger J and Palfrey HO : Specific role for the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. EMBO J (1997) **16**, 1565–1574.
 - 22) Galas, M-C, Chasseerot-Golaz S, Dirrig-Grosch S and Bader M-F : Presence of dynamin-syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells. J Neurochem (2000) **75**, 1511–1519.
 - 23) Peito-Huikko M, Salminen T and Hervone A : Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. Histochem (1985) **82**, 377–383.
 - 24) Verhofstad AAJ, Hoekfelt T, Goldstein M, Steinbusch HWM and Joosten HWJ : Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine β -hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla. Cell Tissue Res (1979) **200**, 1–13.
 - 25) Teitelman G, Baker H, Joh TH and Reis D : Appearance of catecholamine-synthesizing enzymes during development of rat sympathetic nervous system. Possible role of tissue environment. Proc Natl Acad Sci USA (1979) **76**, 509–513.
 - 26) Millar TJ and Unsicker K : Catecholamine-storing cells in the adrenal medulla of the pre- and postnatal rat. Acetylcholinesterase as a means for early discrimination of cell types. Cell Tissue Res (1981) **217**, 155–170.
 - 27) EI-Maghraby M and Lever JD : Typification and differentiation of medullary cells in the developing rat adrenal. A histochemical and electron microscopic study. J Anat (1980) **131**, 103–120.
 - 28) Coulter CL, McMillen C and Browne CA : The catecholamine content of the perinatal rat adrenal gland. Gen Pharmac (1988) **19**, 825–828.
 - 29) Holgert H, Schalling M, Hertberg T, Lagercranz H and Hoekfelt T : Changes in levels of mRNA coding for catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptide Y in the adrenal medulla of the newborn rat. J Devl Physiol (1991) **16**, 19–26.
 - 30) Hinshaw, JE : Dynamin and its role in membrane fission. Annu Rev Cell Dev Biol (2000) **16**, 483–519.
 - 31) Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA and Palfrey HC : Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. Proc Natl Acad Sci USA

- (1995) **92**, 8328—8332.
- 32) Liu J-P and Robinson PJ : Dynamin and endocytosis. *Endocrine Rev* (1995) **16**, 590—607.
- 33) Yang Z, Li H, Chai Z, Fullerton MJ, Cao Y, Toh B-H, Funder JW and Liu J-P : Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* (2001) **276**, 4251—4260.
- 34) Butler MH, David C, Ochoa GC, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P : Amphiphysin II (SH3P9 ; BIN1) , a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* (1997) **137**, 1355—1367.
- 35) Leprince C, Romero F, Cussac D, Vayssiere B, Berger R, Tavitian A and Camonis JH : A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J Biol Chem* (1997) **272**, 15101—15105.
- 36) Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I and McPherson PS : Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J Biol Chem* (1997) **272**, 16700—16706.
- 37) Tsutsui K, Maeda Y, Tsutsui K, Seki S and Tokunaga A : cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue specific expression of its multiple splice variants. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) **236**, 178—183.
- 38) Wigge P and McMahon HT : The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapses. *Trends in Neurosci* (1998) **21**, 339—344.

**Expression of amphiphysin I , a nerve terminal-enriched protein,
in the chromaffin cells of the rat adrenal medulla**

Yoko OKAMOTO

**Department of Anatomy III,
Okayama University Medical School,
Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. A. Tokunaga)**

Amphiphysin (amph) I , a protein concentrated in the nerve terminals, plays an essential role in clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicle membrane through an interaction with GTPase dynamin. A specific antibody against amph I revealed that the protein was also expressed in adrenal medullary cells. In the postnatal 11th day (P11) and adult rats, combined fluorescence histochemistry for catecholamine-containing cells with immunohistochemistry for amph I disclosed strong and weak immunochemical signal of amph I in noradrenalin (NA)- and adrenalin (A)-storing cells, respectively. Very strong immunoreactivity to amph I was found in the intramedullary neurons but not in the adrenal cortex. In developmental stages, amph I was discernible in the medullary chromaffin cells on 16th embryonic day (E16), E19, P0 and P2. Dopamin- β -hydroxylase (a catecholamine-synthesizing enzyme converting dopamin to noradrenalin) was immunohistochemically detected in the chromaffin cells during the perinatal periods. Colocalization of amph I with dynamin was seen in NA-cells but not in A-cells. The present findings suggest that amph I in the adrenal medullary NA-and A-storing cells is involved in membrane recycling mechanisms, which may be unique to each cell type, through endocytic activities.