HRP を取り込んだラット咬筋運動ニューロンの アセチルコリンエステラーゼ合成に関する研究

河 岸 重 則・吉 野 賢 一・高 月 義 子
柳 瀬 益 正・天 野 仁 一 郎

九州歯科大学口腔科学講座 (主任: 天野仁一朗教授)

平成 7 年 10 月 25 日受理

The Effects of Retrogradely Transported and Accumulated HRP on the Synthesis of Acetylcholinesterase in the Rat Masseter Motoneurons

Shigenori Kawagishi, Kenichi Yoshino, Yoshiko Takatsuki,
Yoshimasa Yanase and Niichiro Amano

Department of Oral Neuroscience (Chief: Prof. Niichiro Amano)
Kyushu Dental Collge, Kitakyushu, Japan

Whether or not accumulation of retrogradely transported horseradish peroxidase (HRP) in the neuronal cell bodies affects their metabolic profiles was studied by examining the effects on the synthesis of acetylcholinesterase (AChE) in the rat masseter motoneurons. HRP was injected into the left masseter muscle in the experimental animals, but not injected in the control group. Sixteen hours later all rats were administered diisopropyl fluorophosphate to inactivate the existing AChE and then given an additional 1 hour for the synthesis of new AChE. Serial frozen 60 μ m sections of brainstems were processed for AChE activity. The amount of AChE reaction products in the masseter motoneurons was measured by using an image processing system and ratios between the amounts in the right and left masseter motoneurons were calculated. There was no significant difference in the values between the control and experimental groups, suggesting that HRP accumulation in the cell bodies of motoneurons does not affect their synthesis of AChE.

Key words : Horseradish peroxidase / Axonal transport / Retrograde / Masseter motoneuron
/ Acetylcholinesterase / Rat

緒 言

神経軸索内では物質の輸送が行われており、軸索末端から細胞体の方向への物質の運搬は逆行性軸索輸送と呼ばれている。その生理的機能のひとつは軸索自身の状態及び軸索末端周囲の環境についての情報を細胞体に伝達

することであると考えられている^{1,2)}。ある種の物質は軸索末端で細胞外から取り込まれ、逆行性に細胞体まで輸送される。このような外来性の物質は末端周囲の環境の状態を伝えるシグナルとして働き、ニューロンの代謝を変える可能性がある^{1,3)}。

西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish perox-

idase: HRP) は様々なニューロンの末端から非特異的に取り込まれ軸索中を逆行性に輸送されて細胞体に蓄積する。運動ニューロンにおいてはその輸送量はニューロンの興奮準位に比例することが示唆されている⁴⁾。

本研究は軸索末端から取り込まれ細胞体に蓄積した HRP がそのニューロンの代謝に影響を及ぼすシグナルとなる可能性について検討したものである。HRP 逆行性輸送については、HRP が神経解剖学においてトレーサーとして広く用いられることから、HRP の投与方法など、軸索輸送を実験手段として利用する方法論的な研究が詳細に行われている⁵⁻⁷⁾。しかしながら上述のような細胞生理についての基礎的な研究は、HRP の取り込みがリソソームの増殖をもたらすかといったようなリソソームとの関連を調べたものを除いて見あたらない⁸⁻¹⁰⁾。そこで我々は HRP を取り込んだ細胞体の代謝、特に蛋白質の合成を定量的に検討することにした。本研究では運動ニューロン即ちコリン作動性ニューロンの重要な酵素蛋白質である、化学伝達物質分解酵素アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) の合成に着目し、逆行性軸索輸送によりラットの咬筋運動ニューロンの細胞体に蓄積した HRP がニューロンの AChE 合成に影響を及ぼすか否かを組織化学と画像解析装置を用いて検討した。AChE の合成量の測定は、不可逆性の AChE 阻害剤、diisopropyl fluorophosphate (DFP)¹¹⁾ を投与して既存の酵素活性を一旦失活させ、その後一定の時間内に新しく合成された酵素活性を測定することにより行った。

材料および方法

26 匹の Wistar 系雄性ラット (週齢 8 ~ 10) を HRP を投与する実験群と非投与の対照群に分けた。まず咬筋運動ニューロンの細胞体の同定に用いる為、側頭筋及び内側翼突筋の運動ニューロンを蛍光色素 bisbenzimidazole (BB) で逆行性に標識した: エーテル麻酔下、両側の側頭筋及び内側翼突筋に 0.9% 生理食塩水に溶かした 1% BB (Sigma) をハミルトンシリンジに連結した 26 ゲージ注射針を用いて 20 μ l づつ注入した。7 時間後、実験群のラットの左側咬筋に生理食塩水に溶かした 7.5% HRP (Sigma, type IV) 80 μ l を 4 ヶ所に分けて注入した。対照群には HRP を含まない生理食塩水を左側咬筋に注入した。16 時間後硫酸アトロピン (日本薬局方品) 1.5 mg/kg を腹腔に投与、続いてピーナッツ油に溶解した DFP (Sigma) 2 mg/kg を筋注した。その後 1 時間生存させ心灌流固定に供した。ネンブタール 50

mg/kg (腹腔投与) による深麻酔下、ヘパリン 1,000 単位を左心室に投与、続いて生理食塩水 250 ml, 4% パラフォルムアルデヒド・0.35% グルタルアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 350 ~ 450 ml で灌流固定、さらに固定液を 10% 蔗糖・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で置き換えた。脳幹を取り出し、一昼夜 30% 蔗糖・リン酸緩衝液 (pH 7.4) に浸漬した後 (4 $^{\circ}$ C), 厚さ 60 μ m の凍結連続切片を作製した。直ちに無処理の新鮮な凍結切片を 360 nm の励気波長で蛍光顕微鏡 (AH 2-RFL, オリンパス光学) 下に観察、蛍光標識された側頭筋と内側翼突筋運動ニューロン群を写真撮影し、次いで連続する切片を交互に AChE 反応¹²⁾あるいは tetramethyl benzidine を用いた HRP 反応^{13,14)}に供した。

咬筋運動ニューロンの AChE 活性は切片の運動ニューロンに含まれる AChE 反応産物量を測定し、決定した。まず咬筋運動ニューロンの同定を 3 種のニューロン群の位置関係から行った。すなわち、HRP 反応切片中の片側の三叉神経運動核において BB で標識された側頭筋及び内側翼突筋運動ニューロン群は背・外側から HRP 陽性の咬筋運動ニューロン群を取り囲んでいる (図 1 a)。HRP 反応切片におけるこの位置関係と運動核全体の大きさを基準にして、この HRP 反応切片に連続する隣りの AChE 反応切片の咬筋運動ニューロン群を、AChE 反応前後の蛍光 (図 1 b 及び c) から同定した。次いで咬筋運動ニューロン群の AChE 反応産物量を Kawagishi ら (1992)⁴⁾ の開発した方法を応用して以下のように決定した。咬筋運動ニューロン群の中心部分の一定範囲 (270 $\times$ 270 μ m, 図 1 d) 内の AChE 反応によって染色された部分の面積を高、中及び低の 3 段階の染色濃度レベルで画像解析装置 (SPICCA, 日本アビオニクス) を用いて測定した。得られた 3 つの値の合計をその切片の咬筋運動ニューロン群の AChE 反応産物量とした。片側の脳幹から得られた切片のうち、HRP 反応で濃く染色された 3 枚の切片に隣り合った 3 枚の AChE 反応切片について反応産物量を決定し、その合計値を片側の三叉神経運動核の咬筋運動ニューロン群の AChE 活性とした。

HRP の取り込みの影響の検討は、各々のラットで左右側の咬筋運動ニューロン群の AChE 活性の比を求め、HRP を投与した実験群と投与しなかった対照群間で比の値に有意差があるか否かを t-テストで検定することにより行った。

結果および考察

図1 HRP あるいは AChE 反応を施した連続切片の三叉神経運動核の顕微鏡像。 a : HRP 反応切片の蛍光顕微鏡像。 HRP 陽性の咬筋運動ニューロンと BB ラベルの側頭筋、内側翼突筋運動ニューロンが観測できる。 b : a の切片の吻側側の無処置の切片の蛍光顕微鏡像。 c : b の切片の AChE 反応後の蛍光顕微鏡像。 AChE 反応後、蛍光色素の殆どは消失してしまっているけれど痕跡を側頭筋、内側翼突筋運動ニューロン群の位置に確認できる。 蛍光顕微鏡下ではあるが、AChE 陽性の細胞体も確認できる。 d, c の切片の低濃度レベルでの 2 値画像。 AChE 切片の濃淡画像を 3 段階の濃度レベルで 2 値画処理し、おのこの 2 値画像でこの写真のように四角で囲まれた領域内の染色部分の面積を測定した。 M, 咬筋運動ニューロン群; T, 側頭筋運動ニューロン群; Pm, 内側翼突筋運動ニューロン群; L, 外側; D, 背側。 スケールは 200 μ m。

DFP は AChE のセリン残基を不可逆的に燐酸化することにより活性を阻害する¹⁰⁾。まず、この阻害剤が三叉神経運動核の AChE 活性をどの程度阻害するかまた既存の酵素活性の阻害後組織化学的に検出可能な酵素量が新たに合成されるのに DFP 投与時からどの位の時間が必要かを調べた。ラットに DFP を投与、生存時間をか

えて、心灌流固定に供し、脳幹の切片を作製、AChE 反応を施した。DFP 処理をしないと、ニューロピルにも強い活性が存在するため運動核全体が染色され細胞体を観察することは全くできなかった(図 2 a)。投与後 20 分、ほとんどの AChE が阻害され、活性は検出されなかった(図 2 b)。1 時間後、酵素が新たに合成され

図2 三叉神経運動核の AChE 反応像と DFP 処理。a : DFP を投与していないラット。b : DFP 投与後 20 分生存させたラット。c : DFP 投与後 1 時間生存。d : DFP 投与後 3 時間生存。L, 外側; D, 背側。スケールは 200 μ m。

細胞体内に存在しているのが認められた (図 2 c). その後活性は増え続けた (図 2 d). これらの結果により DFP はその投与時点からの新しい酵素の合成を測定する実験に使用できることが示された. 通常の組織化学においては DFP 投与後の生存時間は 4 から 8 時間程度が推奨されているが, 本研究の酵素活性の測定実験においては, 1 時間で活性が検出可能であったこと, 合成速度の比較には初速を測定するのが望ましいことから, 生存時間を 1 時間とした.

AChE 活性は三叉神経運動核に存在する全ニューロンがもっている. その為測定に際しては AChE 反応によって染色されたニューロン群の中から咬筋運動ニューロンを同定することが必要である. その時, その代謝に影響を与えることは避けなければならないので, 運動核内で咬筋運動ニューロン群をそれぞれ背側及び外側から囲んでいる側頭筋と内側翼突筋の運動ニューロン群^{15,16)}を蛍光色素 BB で逆行性に標識し, それを基に間接的に同定することを試みた. 運動ニューロンにおける BB の逆行性軸索輸送はネコの前肢の運動ニューロンで報告されている¹⁷⁾. 今回 BB がラットの咀嚼筋運動ニューロンの逆行性標識にも有効であることをまず確認するため, 側頭筋と内側翼突筋に BB を筋注し, 生存時間をかえて心灌流固定を施し, 脳幹の凍結切片を作製, 蛍光顕微鏡で観察した. その結果, 咬筋に筋注された HRP が運動ニューロンの細胞体に十分に蓄積する 16 時間の生存時間で⁴⁾, BB も側頭筋と内側翼突筋の両運動ニューロンを標識することが可能であったが, そのラベルは薄かった. 標識は時間とともに強くなり, 筋注後 24 時間までには両運動ニューロン群の細胞体は BB で充分満たされ 2 つの運動ニューロン群の全体を同定できるようになった (図 1 b). そこで本実験では心灌流固定 24 時間前に BB を筋注することにした. この標識は切片に AChE 反応を施している際に殆ど消失してしまい, 痕跡程度の BB しか残らないが (図 1 c), AChE 反応前の蛍光顕微鏡写真とあわせて用いることにより, 咬筋運動ニューロンの同定に有効であることが判明した.

図 3 は左側咬筋に HRP を筋注した実験群と非投与である対照群それぞれのラットの左右側の咬筋運動ニューロン群の AChE 活性の比 (左側/右側) をグラフで示したものである. AChE 活性の左右の比は実験群 (12 匹) で 0.77 ~ 1.19 (平均 ± 標準偏差 = 0.95 ± 0.12), 対照群 (14 匹) で 0.74 ~ 1.24 (平均 ± 標準偏差 = 0.96 ± 0.14) であった. 実験群と対照群での値に有意差は認められなかった.

図 3 咬筋運動ニューロンの AChE 活性の左右側の比. 実験群では左側咬筋に HRP が投与された. 対照群は非投与.

本実験の結果から咬筋運動ニューロン細胞体における HRP の蓄積は酵素蛋白質 AChE の合成に影響を与えないことが示唆される. HRP はリソソームに取り込まれ細胞質から隔離され⁸⁾不活性であり, リソソームが正常に機能している限り, いかに大量の外来物質を含むリソソームが存在しても細胞の生理的状态は変わらないのかもしれない. 逆行性輸送された物質がニューロンの代謝の変化を引き起こした場合, 何らかの因子が核内へ入り転写 (transcription) のレベルを変えている可能性がある. 最近, 核蛋白質に認められる nuclear localization signal sequence が, アメフラシで人工的にそれを結合したある蛋白質の軸索末端から細胞体への逆行性輸送及び核内への移送を仲介するということが報告された¹⁸⁾. これから, 輸送された物質が転写を通してニューロンの代謝に影響を与えるためにはそれ自身が signal sequence を持つか, あるいは signal sequence を持つ物質を活性化することが必要であることが示唆される.

細胞体に蓄積した HRP はニューロンの代謝に影響を与えないようにみえるが, 細胞体で不活性な HRP のような外来性の物質をニューロンが神経末端から取り込むことの意味の解明は興味ある問題として残っている.

結 論

HRP は筋に注入すると運動ニューロン末端から取り込まれ逆行性輸送により運ばれて細胞体に蓄積する. こ

の蓄積した HRP がそのニューロンの対謝に影響を及ぼすか否かをラットの咬筋運動ニューロンの AChE の合成を指標として検討した。HRP を左側咬筋に注入したラットを実験群 (12 匹) とし、非注入ラットを対照群 (14 匹) とした。HRP 注入 16 時間後、不可逆性の AChE 阻害剤 DFP を投与して既存の AChE を失活させ、さらに 1 時間生存させ AChE を再生させた。心灌流固定を施し、脳幹の凍結連続切片を作製し、AChE 反応に供した。AChE 反応切片に存在する咬筋運動ニューロン内の AChE 反応産物量を顕微画像解析装置を用いて定量し、左右側咬筋運動ニューロン間の AChE 反応産物量の比を求めた。左側咬筋 HRP 注入の実験群と HRP 非注入の対照群間でこの比の値に有意差はなかった。以上の結果は細胞体での HRP の取り込みが AChE 合成に対して影響を与えないことを示唆している。

引用文献

- 1) Bisby, M. A. : Functions of retrograde axonal transport. *Fed. Proc.* 41 : 2307-2311, 1982.
- 2) Bisby, T. A. : Does recycling have functions other than disposal? In : *Axonal Transport* (ed. by Smith, R. S. and Bisby, M. A.). Alan R. Liss, Inc., New York, 1987, 365-383.
- 3) Thoenen, H. and Edgar, D. : Neurotrophic factors. *Science*. 229 : 238-242, 1985.
- 4) Kawagishi, S., Yoshino, K., Jones, T. E., Iwamoto, M., Arai, S. and Amano, N. : Dopamine receptor antagonists increase markedly the quantity of retrograde transport of HRP in the rat masseteric motoneuron. *Brain Res.* 585 : 196-204, 1992.
- 5) Kristensson, K., Olsson, Y. and Sjöstrand, J. : Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Brain Res.* 32 : 399-406, 1971.
- 6) Lavail, J. H. : The retrograde transport methods. *Fed. Proc.* 34 : 1618-1624, 1975.
- 7) Sittiracha, T. and McLachlan, E. M. : Evaluation of the effects of various additives on retrograde labelling by horseradish peroxidase applied to intact and transected hindlimb nerves of rat and rabbit. *Neuroscience*. 18 : 763-772, 1986.
- 8) Kristensson, K. and Olsson, Y. : Uptake and retrograde axonal transport of protein tracers in hypoglossal neurons. Fate of the tracer and reaction of the nerve cell bodies. *Acta neuropath. (Berl)*. 23 : 43-47, 1973.
- 9) Broadwell, R. D. and Brightman, M. W. : Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein *in vivo*. *J. Comp. Neur.* 185 : 31-74, 1979.
- 10) Gatzinsky, K. P. and Berthold, C.-H. : Lysosomal activity at nodes of Ranvier during retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in alpha-motor neurons of the cat. *J. Neurocytol.* 20 : 989-1002, 1990.
- 11) Butcher, L. L. : Acetylcholinesterase histochemistry. In : *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 1 (ed. by Björklund, A. and Hökfelt, T.). Elsevier, Amsterdam, 1983, 1-49.
- 12) Karnovsky, M. J. and Roots, L. : A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12 : 219-221, 1964.
- 13) Mesulam, M.-M. : Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry : a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* 26 : 106-117, 1978.
- 14) 伊藤和夫 : HRP の順行性、逆行性標識. *生体の科学*. 36 : 360-362, 1985.
- 15) Mizuno, N., Konishi, A. and Sato, M. : Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neur.* 164 : 105-116, 1975.
- 16) Batini, C., Buisseret-Delmas, C. and Corvisier, J. : Horseradish peroxidase localization of masticatory muscle motoneurons in cat. *J. Physiol., Paris*. 72 : 301-309, 1976.
- 17) Illert, M., Fritz, N., Aschoff, A. and Höllander, H. : Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). II. a parametric study in the peripheral motor system of the cat. *J. neurosci. Meth.* 6 : 199-218, 1982.
- 18) Ambron, R. T., Schmied, R., Huang, C.-C. and Smedman, M. : A sign sequence mediates the retrograde transport of proteins from the axon periphery to the cell body and then into the nucleus. *J. Neurosci.* 12 : 2813-2818, 1992.