

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700351

研究課題名 (和文) 中枢神経シナプス前末端におけるカルシウムドメインの生後発達

研究課題名 (英文) Developmental changes in calcium domain at the presynaptic terminal of the central synapse

研究代表者

中村 行宏 (NAKAMURA YUKIHIRO)

同志社大学・研究開発推進機構・研究員

研究者番号：40460696

研究成果の概要 (和文)：シナプス前末端におけるカルシウム (Ca) ドメインは、シナプス伝達の速度や信頼性を決定する重要な因子である。脳幹聴覚伝導路上の巨大シナプス calyx of Held では、生後発達に伴って Ca ドメインがマイクロドメインからナノドメインに移行することが示唆されていたが、その変化のメカニズムは不明であった。本研究では、Ca 感受性色素を calyx へ注入し、共焦点スポット観察 (点スキャン) にてシナプス前末端内の局所 Ca を観察することにより、シナプス前末端 Ca ドメインの可視化を試みた。活動電位によって誘発される Ca の一過性上昇は、聴覚獲得前生後 7 日齢 (P7) calyx ではシナプス側の膜状の随所で観察されたが、聴覚獲得後 P14 ではその空間分布は疎らになり振幅も減少した。シナプス前末端の電位固定実験により、この局所 Ca の減少は、活動電位幅の短縮と Ca チャネル密度の減少に因ることが明らかとなった。P7 calyx に Ca チャネル阻害薬を適用し機能的な Ca チャネル数を減少させた状態で EGTA をシナプス前末端に注入したところ、EGTA の EPSC 抑制作用は減少した。P14 calyx に K チャネル阻害薬を適用し活動電位幅を延長させた状態で EGTA を注入したところ、EGTA の EPSC 抑制作用が復活した。Ca ドメインのサイズは、Ca チャネルの密度と活動電位の幅によって制御され、これらの変化が Ca ドメインサイズの生後発達変化に貢献していることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The Ca domain in presynaptic nerve terminal can determine speed and fidelity of synaptic transmission. At the calyx of Held, in the rat auditory brainstem, intraterminal injection of EGTA attenuates EPSC amplitude before hearing onset (postnatal day (P)7). But this inhibitory effect is almost negligible after hearing onset (P14), implying that Ca domain is developmentally transformed from microdomain into nanodomain. To visualize Ca domain in the nerve terminal, I employed a localized confocal spot detection method and a low affinity Ca<sup>2+</sup> indicator Oregon Green BAPTA/5N, to assess the spatiotemporal profile of single action potential (AP)-evoked Ca<sup>2+</sup> gradients in P7 and P14 terminals. Ca transient were observed in almost every confocal spot locations along synaptic surface at P7, but they were less frequently observed and their amplitude became smaller at P14. Voltage-clamp experiments revealed that both shortening of presynaptic action potential and decrease in Ca channel density contribute to this reduction in Ca transients. To investigate these two mechanisms underlie developmental changes in Ca domain, I performed simultaneous pre- and postsynaptic electrophysiological recordings. Reducing the number of functional Ca channels in P7 terminals with peptide Ca<sup>2+</sup> channel blockers markedly reduced the inhibitory effect of intraterminal EGTA injection on EPSCs. Conversely, at P13-15 synapses, prolongation of AP duration using TEA increased the effect of EGTA on EPSCs. We conclude that both the developmental decreases in Ca<sup>2+</sup> channel density and AP duration contribute to developmental transformation of Ca domain at the calyx of Held synapse, through a decrease in the density of open channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：神経・筋肉生理学

科研費の分科・細目：

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路

1. 研究開始当初の背景

カルシウム (Ca) チャンネルと流入した Ca の標的分子の結合強度は、Ca が開口放出を誘発するために必要な移動範囲 (ドメイン) として表される。Ca ドメインのサイズは、結合速度の異なる Ca 緩衝材を注入することによって推定される。シナプス前末端における Ca ドメインは、シナプス前末端へ注入した EGTA の EPSC への抑制作用から評価することが出来る。Borst ら(1996)は生後 1 週齢の calyx of Held シナプス前末端へ遅い Ca 緩衝剤 EGTA を注入するとシナプス伝達に抑制が生じることを見出し、中枢神経シナプス前末端の Ca ドメインサイズは microdomain であると主張した。しかし Fedchyshyn ら(2005)は、生後 2 週齢の calyx では EGTA の作用は消失し、速い Ca 緩衝剤 BAPTA のみ作用することを報告し、開口放出部位に隣接する Ca ドメインのサイズが生後発達とともに microdomain から nanodomain へ縮小することを示唆した。また同時に、開口放出の誘発に必要な Ca 流入量が減少することを示した。しかし生後発達による Ca ドメインサイズ縮小の分子機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

巨大シナプス前末端構造を有する脳幹聴覚伝導路の calyx of Held を研究モデルとし、中枢神経シナプス前末端における Ca ドメインを Ca イメージング法によって可視化する。また、発達に伴う Ca ドメイン変化を司る分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

【標本の作製】生後 7~15 日齢のラットから台形体核を含む厚さ 200  $\mu\text{m}$  の脳幹の薄切切片を作製し、正立顕微鏡観察下において、calyx of Held シナプス前末端とシナプス後

細胞より whole-cell patch-clamp 法にて記録を行った。

【Ca イメージング】低親和性カルシウム蛍光指示薬 Oregon Green BAPTA 5N (100  $\mu\text{M}$ ) をパッチ電極よりシナプス前末端へ注入し、活動電位によって誘発される Ca 一過性上昇を、前末端のさまざまな場所にて共焦点 spot detection 法によって記録した。Ca の一過性上昇は Ca 蛍光指示薬の蛍光変化として高速の光電子増倍管 (PMT) を用いて 50 kHz で取得した。個々部位の蛍光変化は baseline の蛍光レベルで標準化し、Ca シグナルの振幅は  $\Delta F/F$  として表した。記録部位や生後発達による  $\Delta F/F$  の差を解析した。

【シナプス前末端・後細胞同時記録電気生理実験】脳幹スライスの中付近に platinum-iridium 電極を設置し、calyx of Held シナプス前末端につながる神経線維を電気刺激し MNTB neuron から EPSC を記録した。シナプス前末端膜上には 10 mM EGTA 溶液を含むパッチ電極を cell-attach mode で待機させておき、必要なタイミングでパッチ膜を破り whole-cell mode にして、EGTA をシナプス前末端へ注入した。

【データの記録・解析】光学データ・電気生理データともに A/D コンバータを介してパーソナルコンピュータへ記録した。得られた波形の解析には IgorPro6.03J を使用した。

4. 研究成果

活動電位によって誘発される Ca の一過性上昇を共焦点顕微鏡点スキャンによって観察すると、動物が聴覚を獲得する以前・生後 7-8 日齢 (P7) では、シナプス前末端の放出側辺縁に沿ってサブミリ秒で立ち上がる一過性の Ca 上昇が記録された ( $\Delta F/F \sim 0.5$ ) (図 1)。

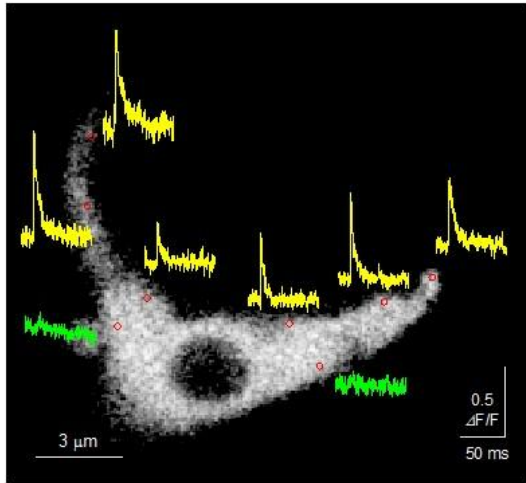


図1. 生後8日齢 calyx of Held シナプス前末端と共焦点スポットで観察された活動電位誘発性一過性 Ca 上昇

しかしこのカルシウム一過性上昇は、聴覚獲得後の生後 13-15 日齢 (P14) では、空間分布が疎になり、振幅も 80%減少することが明らかになった ( $\Delta F/F \sim 0.1$ )。Ca 一過性上昇にドメイン様の空間分布が見られるか、放出側辺縁を 1~1.5  $\mu\text{m}$  にわたりおよそ 0.15  $\mu\text{m}$  の空間解像度で精密にスキャンしたところ、P7 calyx では、幅およそ 1  $\mu\text{m}$  に渡り大きな Ca 一過性上昇を示す領域が存在することが明らかになった (図 2)。このような領域は P7・P14 どちらでも認められたが、P14 ではより局所化する傾向が示された (幅 0.5  $\mu\text{m}$ )。Ca 上昇の空間的局在の生後発達に関しては、本研究では十分に確固たる結論を得るまでには至らず引き続き検討が必要であるが、生後発達する Ca 流入の局所化を示唆するデータを得られた。

一方、Ca 一過性上昇の生後発達に伴う振幅の減少については、活動電位幅の短縮と Ca チャネル密度の減少という 2 つの機構が明らかになった。P14 calyx に K チャネル阻害薬 TEA (1 mM) を投与し活動電位幅を延長させたところ、Ca 一過性上昇の振幅は 50% 増大した。逆に生後 7 日齢 calyx を活動電位波形によって電位固定しその電位幅を短縮させたところ、Ca 一過性上昇の振幅は 50% 減少した。活動電位幅が局所 Ca の流入量を制御していることが確認された。また、1-3 ms の矩形脱分極パルスで誘発される Ca 上昇の振幅を P7・P14 calyx で比較したところ、P14 では P7 の 50%程度まで振幅が低下していることが明らかになった。シミュレーションにより細胞内 Ca バッファーの変化は実験結果を説明し得ないこと、Ca 電流のノイズ解析によって Ca チャネル単一コンダクタンスは変化しないことが示されたことから、シナプス膜上では発達に伴って電位依存性 Ca チャネルの密度が減少していると結論づけ

られ、同様に Ca 一過性上昇の減少に関与していることが明らかになった。

続いて、Ca チャネル密度の減少と活動電位幅の短縮が、Ca ドメイン変化の主因であることを証明するため、シナプス前末端-後細胞からの同時パッチクランプ記録を行った。P7 calyx に Ca チャネル阻害薬  $\omega$ -agatoxin や  $\omega$ -conotoxin を適用し、機能的 Ca チャネル密度を減少させた状態で Ca キレート EGTA をシナプス前末端へ注入したところ、EGTA によるシナプス電流抑制の効果は減少した。逆に生後 14 日齢 calyx に TEA を適用し、活動電位幅を延長させた状態で Ca キレート EGTA をシナプス前末端へ注入したところ、EGTA によるシナプス電流抑制の効果が復活した。活動電位幅と機能的 Ca チャネル密度は、EPSC に対する EGTA の作用を変化させる、すなわち Ca ドメインのサイズを調節できることが示された。

以上により、生後発達に伴う Ca ドメインサイズの変化には、Ca チャネル密度の減少ならび活動電位幅の短縮が寄与していることが明らかになった。

これらの研究成果を、以下の学会で発表報告を行った。また現在学術雑誌に投稿中である。

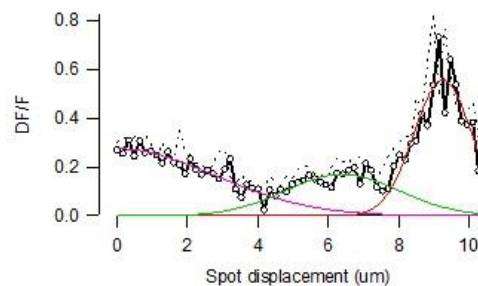
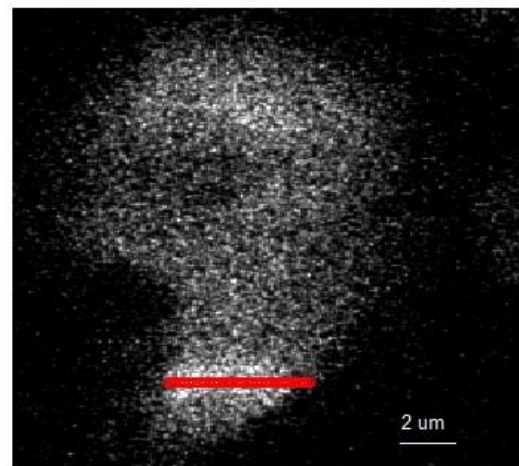


図2. 生後 8 日齢 calyx of Held シナプス前末端における Ca 一過性上昇の局在

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 中村行宏, Silver RA, DiGregorio DA, 高橋智幸: “シナプス前終末における伝達物質放出機構-Ca 結合の生後発達変化” 生理学研究所研究会『シナプス伝達 of 概念指向型研究』 (20091111). 岡崎市
- ② Nakamura Y, Silver RA, DiGregorio DA, Takahashi T: “Developmental reduction in functional  $Ca^{2+}$  channel density tightens  $Ca^{2+}$ -secretion coupling at a central excitatory synapse.” The Society for Neuroscience 39th Annual Meeting. (20091019). Chicago, IL, U.S.A.

[その他]

ホームページ等

<http://synapse.doshisha.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 行宏 (NAKAMURA YUKIHIRO)  
同志社大学・研究開発推進機構・研究員  
研究者番号: 40460696

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し