

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700474

 研究課題名（和文） 中枢シナプス前末端 Ca チャネル密度と単一チャネルコンダクタンスの
生後発達変化

 研究課題名（英文） Developmental changes in Ca channel density and single channel
conductance at the presynaptic terminal of central nervous system

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）：脳幹巨大シナプス前末端 calyx of Held に発現する電位依存性カルシウムチャネルの数とコンダクタンスを、パッチクランプ法およびカルシウムイメージングを用いて調べた。単一チャネルコンダクタンスは約 2 pS、神経開口放出部位におけるカルシウムチャネル密度は約 250 個/ μm^2 であり、聴覚の獲得に伴う生後発達の過程を通じこの値はおよそ一定であった。この発達の期間を通じてカルシウムチャネルはクラスターを形成しており、神経伝達物質放出機構はカルシウムチャネルから 30~50 nm の距離に位置すると推定される。

研究成果の概要（英文）：Using patch-clamp technique and Ca^{2+} -imaging, I investigated the number and conductance of voltage-gated Ca^{2+} channels expressed in the giant presynaptic nerve terminal calyx of Held in the auditory brainstem. The estimated single channel conductance was ~2 pS and its local density at release site ~250/ μm^2 , both of which remain unchanged during the postnatal development across hearing onset. Throughout this period, multiple Ca^{2+} channels make a cluster. The distance between Ca^{2+} channels and release machinery for neurotransmitter is estimated as 30-50 nm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス・神経回路・プレシナプス・カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

シナプス前末端における神経伝達物質の開口放出は、電位依存性 Ca チャネルを介したシナプス前末端への Ca^{2+} 流入によって誘発される。拡散速度の遅い Ca^{2+} は細胞内において局所シグナルとしてはたらくため、前末端内における Ca^{2+} の流入や濃度の上昇は均一ではない。開口放出の量や速度は、シナプス小胞近傍の局所 Ca^{2+} の動態によって微細に制御される。シナプス前末端内部における Ca^{2+} 局所濃度の時空間分布や、その制御要因を明らかにすることは、シナプス伝達の基礎メカニズムの理解に必須である。

シナプス前末端に発現する Ca チャネルの数（密度）や局所分布、単一チャネルコンダクタンスは、シナプス小胞近傍の局所 Ca^{2+} の動態に影響し、シナプス小胞の開口放出を直接的に支配する。しかし微細な神経前末端からの直接的な記録が困難であり、シナプス前末端に発現する Ca チャネルについて、単一チャネルレベルでの詳細は明らかではなかった。

2. 研究の目的

脳幹の聴覚伝導路上のシナプス calyx of Held におけるシナプス前末端の Ca チャネル

の密度や単一チャンネルコンダクタンスを明らかにする。また聴覚獲得を挟む生後発達の過程で、これらの指標に変化が見られるか調べる。さらに、Caチャンネルの密度・分布や単一チャンネルコンダクタンスが、Caチャンネルと伝達物質放出機構の結合距離やシナプス小胞の放出確率に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

【標本の作製およびパッチクランプ記録】生後7~21日齢のラットから台形体核を含む厚さ200 μm の脳幹薄切片を作製した。顕微鏡観察下にて calyx of Held シナプス前末端へ全細胞パッチクランプ法を適用し、脱分極によって誘発される Ca^{2+} 電流を記録した。またシナプス前末端とシナプス後細胞から同時パッチクランプ記録を行い、前末端の活動電位によって誘発される興奮性シナプス電流 (EPSC) を記録した。

【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 μM) をパッチ電極よりシナプス前末端へ注入し、脱分極によって誘発される Ca^{2+} 一過性上昇を、共焦点 spot detection 法によってシナプス前末端の神経伝達物質放出部位から記録した。 Ca^{2+} 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 100 kHz で取得した。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。

【データの記録・解析】電気生理データおよびイメージングデータは 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 IgorPro6.22J を使用した。

Ca^{2+} 電流のノイズ解析は Sigworth (1980) の方法に基づいて行った。同一の脱分極パルスを複数回負荷することによって記録された 50~100 の Ca^{2+} 電流波形の平均の波形を作成し、波形上の各時点における分散をその時点の平均に対してプロットした。このプロットを確率分布を示す 2 次関数でフィットした。フィットした曲線の原点における傾きから単一チャンネル電流の振幅を、x 軸との交点から Ca チャンネルの総数を推定した。

【シミュレーション】600 nm 四方のシミュレーション空間内に仮想的なアクティブゾーンを設定し、その内部に 1~28 個の Ca チャンネルをさまざまな密度で配置した。活動電位によって活性化する Ca チャンネルの開口による Ca^{2+} 流入の細胞内での拡散の結果として生じる局所 Ca 変化のシミュレーションを行った。計算には共同研究者の Jason Rothman 博士 (UCL) によって開発された 3 次元拡散プログラムを用いた。 Ca^{2+} バッファーには Xu ら (1997) のパラメーターを用いた。この Ca^{2+} 拡散シミュレーションによって得られた波形

をテンプレートとし、Kochubey ら (2009) による神経伝達物質放出モデルを用いてシナプス小胞放出シミュレーションを行った。小胞放出シミュレーションには IgorPro6.22J を用いた。

4. 研究成果

(1) シナプス前末端に発現する Ca チャンネルの密度とコンダクタンスの電流ノイズ解析による推定

聴覚の獲得前、生後 1 週齢の calyx of Held シナプス前末端からパッチクランプ法によって Ca^{2+} 電流を記録しノイズ解析を行った。単一チャンネル電流の振幅は約 0.1 pA (固定電位 0 mV)、単一チャンネルコンダクタンスは約 2pS と推定された。またシナプス前末端に発現する Ca チャンネルの総数は 10000~20000 個と推定された。聴覚の獲得後、生後 2 週齢のシナプス前末端からの記録においても同様の値が得られた。聴覚の獲得前後の生後発達の期間で、Ca チャンネルの単一チャンネルレベルの性質はおおよそ変化しないという結果を得た。

実験の過程で、該シナプス前末端における Ca^{2+} 電流ノイズ解析における技術的問題点に直面した。Calyx of Held は太い神経軸索の先端に位置し、この軸索に由来する膜容量成分が Ca^{2+} 電流記録のノイズを増大させ、単一チャンネル電流推定の妨げとなる。軸索の膜容量成分に起因するノイズの低減には、 Ca^{2+} 電流の誘発に弱い脱分極を用いるのが効果的であった。しかし弱い脱分極では大きな振幅の電流を誘発できないためシナプス前末端の Ca^{2+} チャンネル総数の見積もりは不可能である。このような技術的問題の解決に取り組んでいるさなかの 2012 年 6 月、米国 NIH の Wu 博士の研究グループによって、該シナプス末端の単一チャンネルコンダクタンスを 3pS とする報告がなされた。この手法による単一チャンネルコンダクタンスの導出は、本研究で目指したノイズ解析による推定よりも信頼性が高いとされる。データの新規性および信頼性を鑑み、この時点でノイズ解析による単一チャンネルコンダクタンスの導出の科学的メリットは薄れたと判断。研究の方向性をシフトすることにした。

Ca チャンネルの分布・密度については、生理学研究所重本隆一教授研究室との共同研究で、電子顕微鏡画像を用いた解析を行うことにした。また新たにシミュレーションの手法を取り入れ、Ca チャンネル密度・コンダクタンスが伝達物質放出機構との結合距離やシナプス小胞の放出確率に与える影響の検討を開始することにした。

(2) 共焦点スポット Ca^{2+} イメージングによる局所 Ca チャンネル数の推定

シナプスの放出膜直下で脱分極パルスによって誘発される Ca^{2+} 一過性上昇の振幅は約 0.24 ($\Delta F/F$) であり、生後 1~3 週齢の間で有意な差が認められなかった。単一チャンネルコンダクタンスの値を Ca^{2+} 拡散シミュレーションに導入し、共焦点スポット内部における開口 Ca^{2+} チャンネルの数を推定した。実験で観察された Ca^{2+} 一過性上昇の振幅のシミュレーション環境下で再現するには、開口放出部位（アクティブゾーン）に 10~15 個の Ca^{2+} チャンネルを配置する必要がある。共焦点スポットのサイズを考慮して Ca チャンネルの密度に換算すると、開口放出部位近傍には約 250 個/ μm^2 の密度で Ca チャンネルが存在すると推定された。

(3) Ca チャンネルの密度、単一チャンネルコンダクタンスが Ca チャンネル-伝達物質放出機構の結合強度に与える影響

Ca チャンネルと神経伝達物質放出機構の結合距離は、シナプス前末端に注入した Ca キレート EGTA (10 mM) の EPSC 抑制作用にもとづいて推定できる (Naraghi & Neher, 1997)。シナプス前末端とシナプス後細胞から同時パッチクランプ実験において、calyx of Held へ注入した EGTA は、生後 7 日齢のシナプスでは EPSC の振幅を 70%、生後 14~21 日齢のシナプスでは 50%抑制した。このような EGTA の抑制作用が示される伝達物質放出機構と Ca チャンネルの距離が、 Ca チャンネルの分布によってどのように調節されるのか、シミュレーションによって検討した。

アクティブゾーンに Ca チャンネルが 1 個存在し単独で神経伝達物質放出を制御する場合、EGTA による EPSC 抑制が 50%であるのは、放出機構が Ca チャンネルから 27 nm の距離に存在するときであった。アクティブゾーンに Ca チャンネルが複数存在する場合でも、その密度が約 1000 個/ μm^2 以下であれば、 Ca チャンネルの個数によらず、放出機構は最寄りの Ca チャンネルから 25~30 nm の距離に存在すると推定された。一方、アクティブゾーンの Ca チャンネル密度を 2000 個/ μm^2 以上へ上げると、 Ca チャンネルと放出機構の距離を 50 nm 以上に設定しないと、実験データをうまく説明できない。しかし電子顕微鏡像の解析によって得られたシナプス前末端開口放出部位近傍の Ca チャンネル密度は 1 μm^2 あたり数百個のオーダーであり、1000 個/ μm^2 以上の Ca チャンネル密度の仮定は現実的ではない。従ってシナプス小胞放出機構と Ca チャンネルの距離は生後 2 週齢以降の場合常に 30 nm であると推定された。また生後 1 週齢のシナプス前末端では同様の計算により 50nm 程度であると推定された。一方、アクティブゾーンあたりの小胞の放出確率は、 Ca チャンネル内の密度には影響されず、 Ca チャンネル数に正の相関があった。

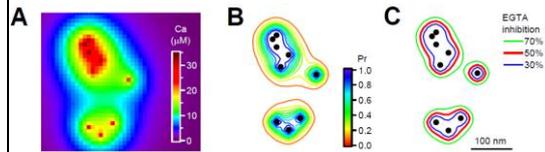


図 1: 電子顕微鏡で観察した Ca チャンネルの分布に基づいた Ca^{2+} 拡散および神経伝達物質放出シミュレーション。アクティブゾーン近傍の Ca^{2+} 濃度の空間分布 (A)、放出確率の空間分布 (B)、EGTA による EPSC 抑制作用の空間分布 (C)。

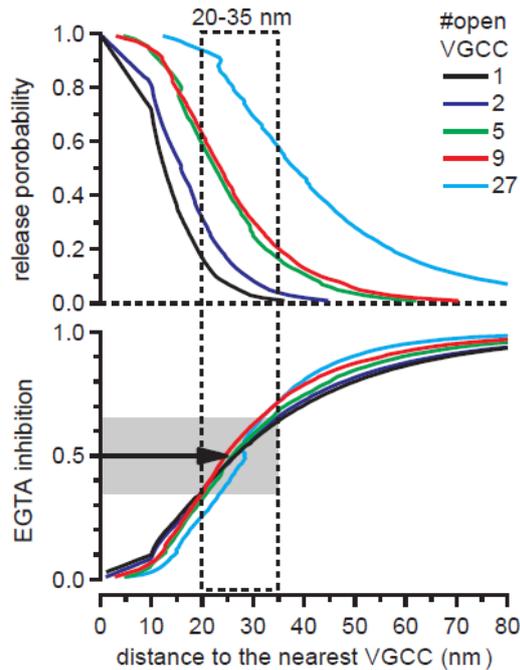


図 2: シナプス小胞の放出確率 (上) および EGTA による放出抑制作用 (下) を放出機構から最寄りの Ca チャンネルまでの距離の関係。

この結果は、アクティブゾーン内の Ca チャンネルの密度は Ca チャンネルと伝達物質放出機構との距離を、 Ca チャンネルの数はアクティブゾーンあたりの小胞の放出確率を制御する要因であることを理論的に示したものである。発達の期間を通じて、 Ca チャンネルと神経伝達物質放出機構の距離は、30~50 nm の範囲にとどまることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 第 35 回日本神経科学大会
2012 年 9 月 19 日 名古屋
中村行宏, 原田春美, 釜澤直美, 松井広,

重本隆一, Jason Rothman, Angus Silver,
David DiGregorio, 高橋智幸
成熟した中枢神経において多数の Ca チャネル
によって媒介される速いシナプス伝達

(2)Conferences Jacques-Monod “ Imaging
neuronal functions: from molecules to
circuits”

2012年7月2日 Roscoff フランス
中村行宏, 原田春美, 釜澤直美, 松井広,
重本隆一, Jason Rothman, Angus Silver,
David DiGregorio, 高橋智幸

Developmental changes in spatial profiles
of Ca²⁺ channel and Ca²⁺ influx underlying
tightening of Ca²⁺-secretion coupling at
the calyx of Held

(3) 高雄醫學大學国際シンポジウム”
Physical Concepts of Medical Science”

2012年5月18日 高雄 台湾
Developmental changes in presynaptic Ca
signaling at the calyx of Held
中村行宏

(4) OIST International Workshop
“Molecular & Structural Organization of
Presynaptic Function and Plasticity”

2011年9月8日 沖縄恩納村
Developmental changes in the spatial
distribution of Ca²⁺ signals at the calyx
of Held
中村行宏, David A. DiGregorio, 高橋智幸

[図書] (計2件)

(1) 岡田泰伸編 Patch Clamp Techniques:
From Beginning to Advanced Protocols
(Springer) 2012年3月 pp.137~145 Chapter8
高橋智幸, 堀哲也, 中村行宏, 山下貴之 (共
著)

(2) 岡田泰伸編 最新パッチクランプ実験
法 (吉岡書店) 2011年6月 pp.96~102 第8
章 高橋智幸, 堀哲也, 中村行宏, 山下貴之
(共著)

[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・研究開発機構・研究員

研究者番号: 40460696