

グリシン(Gly)遊離に関する神経終末部の Ca^{2+} チャンネル

野 中 喜 久 正 代 清 光 前 田 恵

K⁺チャンネル阻害による緩徐脱分極で生じるグリシン (Gly) 作動性神経終末からの自発性 Gly 遊離によって誘起される抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の頻度増加が、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの L 型ブロッカーであるニフェジピン、P/Q 型ブロッカーの ω -アガトキシンおよび N 型ブロッカーの ω -コノトキシンの存在下で消失した。このことは L 型、P/Q 型、N 型の Ca^{2+} チャンネルが Gly 作動性神経終末部に存在し、伝達物質であるグリシンの遊離を制御していることを示唆する。また、この神経終末部には細胞内遊離 Ca^{2+} によって賦活される BK と IK チャンネルも存在した。

キーワード: 'シナプス・ブートン' 標本, 神経終末, グリシン遊離, Ca^{2+} チャンネル

I. はじめに

中枢神経の神経終末部からは様々な神経伝達物質が放出される。そのシナプス前神経終末部には伝達物質を貯蔵しているシナプス小胞が存在し、小胞は膜に融合して Ω 型となりシナプス間隙に伝達物質を放出する。これはエキソサイトーシス (開口放出) と呼ばれ、この伝達物質の放出形式には活動電位依存性の遊離と活動電位非依存性の自発性的遊離の 2 種類がある。また、このエキソサイトーシスには細胞外から流入した Ca^{2+} と細胞内 Ca^{2+} ストアー (IICR や CICR) から放出された遊離 Ca^{2+} が関わりあっている。

抑制性神経伝達物質であるグリシン (Gly) の場合、活動電位が軸索末端まで到着すると、脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開き、濃度勾配に沿って Ca^{2+} が細胞内に流入する。流入した Ca^{2+} は、伝達物質の Gly を封入しているシナプス小胞と神経終末部膜との融合を促進する。シナプス間隙に放出された Gly は、シナプス下膜の Gly 受容体に結合して、Gly 受容体に内蔵されている Cl^- チャンネルを開口して Cl^- を細胞外から細胞内へと流入させ抑制性シナプス後電流 (IPSC) を発生させる。

今回、我々は Gly 作動性神経終末部に存在する Ca^{2+} チャンネルの種類を明らかにすることに着目した。大半の中枢神経の微小シナプス前神経終末部の直径は 1 μm 未満と小さく、直接パッチ記録法を適用することが困難である。従って、本実験では、機

械的単離によりラット脊髄背側交連核 (SDCN) ニューロンの 'シナプス・ブートン' 標本作製し、シナプス下膜である SDCN ニューロンの細胞体に、ホールセルパッチ記録電極を接着し、微小神経終末部からの Gly の放出によって発生する自発性の抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を記録し、これを指標として終末部上のどのような Ca^{2+} チャンネルが Gly 遊離に関与しているのか間接的に調べた。

II. 方 法

1. 標本

生後 10~15 日齢のウイスター系ラットにネブタールを腹腔内投与 (50mg/kg) して麻酔後、脊髄を摘出した。氷冷した、95% O_2 - 5% CO_2 ガスで飽和したインキュベーション溶液で満たしたチャンバーに脊髄を設置し、マイクロスライサーで厚さ 400 μm の脊髄薄切片 (スライス) 標本作製した。スライス標本は室温のインキュベーション溶液中に 1 時間放置し、神経機能を十分に回復させた後、標準細胞外液で満たした培養皿に移した。その後、実体顕微鏡下にスライス標本表面の SDCN 領域を確認し、先端を丸くした微小ガラスピペット先端を標本表面に接触させ 0.3~0.5mm の振幅で 50~60Hz の機械的振動を与えて、SDCN ニューロンの 'シナプス・ブートン' 標本作製した。単離したこのニューロンには、興奮性のグルタミン酸 (Glu) や抑制性の Gly および GABA 作動性神経終末部が正

常機能を保持したまま多数付着している。今回の実験では、mIPSCのみを観察するために、薬理的にシナプス下膜上のGluやGABA受容体を抑制して実験を遂行した。Glu受容体を阻害するには6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione(CNQX)とdl-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5)を、GABA_A受容体の阻害剤としてbicucullineを用いた。さらにNa⁺チャネルの選択的阻害剤であるtetrodotoxin(TTX)を用いGlyのmIPSCを記録した。

2. 細胞内液と薬液投与法

細胞内液はK⁺の代わりにCs⁺内液を用い、pHをTris-baseにより7.2に調整した。薬物は標準細胞外液に溶解し、Yチューブ法により急速投与した¹⁾。Yチューブ法は、電磁弁、減圧ビンおよび吸引ポンプを利用して単一細胞周囲の細胞外液を20msec以内に交換可能な急速外液交換法である。Yチューブの先端は3次元マイクロマニピュレーターを用い、記録する単離ニューロン細胞に薬液が直接与えられるように配置した。

3. 記録方法

シナプス下膜にあたるSDCNニューロン細胞体にホールセルパッチ記録法を適用し、室温で、膜電位を0 mV ($V_H = 0$ mV)に固定下、Gly作動性微小神経終末部からの自発的なGly放出によって発生するmIPSCの発現頻度や電流の大きさを指標とし、間接的にシナプス前神経終末部へのCa²⁺の影響を検討した。

Ⅲ. 結果と考察

1. 4-aminopyridin (4-AP) の効果

図1はK⁺チャネルの阻害剤である4-APによる影響をみたものである。30 μ M 4-APによってmIPSCの頻度が422.9 \pm 38% (平均 \pm 標準誤差)に増加 ($p < 0.001$)したが、振幅には変化がなかった (146.9 \pm 29%)。興奮性膜を持った細胞は、静止時にはK⁺に対する選択的透過性が大きく、その他のイオンに対する透過性は極めて小さい。よって4-APなどのK⁺チャネルの非選択拮抗薬を作用させると、K⁺チャネルの阻害が生じ、結果として細胞は脱分極する。そのため、電位依存性Ca²⁺チャ

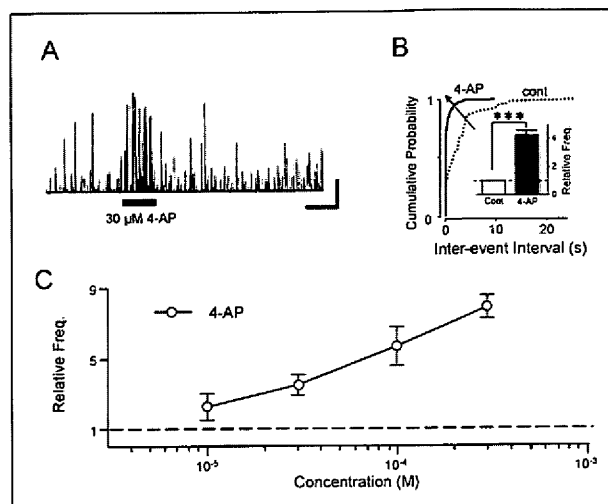


図1 Glyで惹起される自発性後電流のmIPSCへのK⁺チャネル阻害剤の効果

- A: 30 μ M 4-APを加えたときのmIPSCの変化。
 B: コントロールおよび4-APを加えたときのmIPSCの発生頻度の比較。図中に示したヒストグラムは、解析を行った17個の細胞における平均頻度数。*** $p < 0.05$
 C: 4-APの濃度-mIPSC頻度の関係。4-APの濃度依存性にmIPSCの頻度が増加する。

ネルが開口しCa²⁺が細胞内へ流入する。流入したCa²⁺により、細胞内のCa²⁺濃度が上昇し、さらにCa²⁺ストアからのCa²⁺放出が起こる。これらの遊離Ca²⁺によって小胞体からのGly放出は促進される。また、mIPSCを指標として観察したGly放出頻度は4-APの濃度依存的に増加したが、電流の大きさは変化しなかった。

2. 無Ca²⁺外液中での4-APとカドミウム(Cd²⁺)の効果

細胞外液中のCa²⁺を取り除き、無Ca²⁺状態で4-APによる影響を観察した(図2)。まず、正常外液中(2 mM Ca²⁺)で4-APによりGlyの遊離が促進されることを確認し(図2 A a), 次に外液をCa²⁺濃度2 mMからEGTAを含む無Ca²⁺溶液にした状態で、4-APを添加すると頻度、振幅共に変化しなかった(図2 A b)。これは細胞内にCa²⁺の流入が生じないと伝達物質であるGlyの遊離が起こらないことを示す。すなわちGlyの放出には細胞内へのCa²⁺の流入が必須であることが確認された。さらに、Ca²⁺を含む外液であっても、Ca²⁺チャネルの非選択的阻害剤であるCd²⁺の存在下で、4-APの作用はみられなかった。(図2 B)。したがってCa²⁺チャネルの開口によるCa²⁺の細胞内への流入

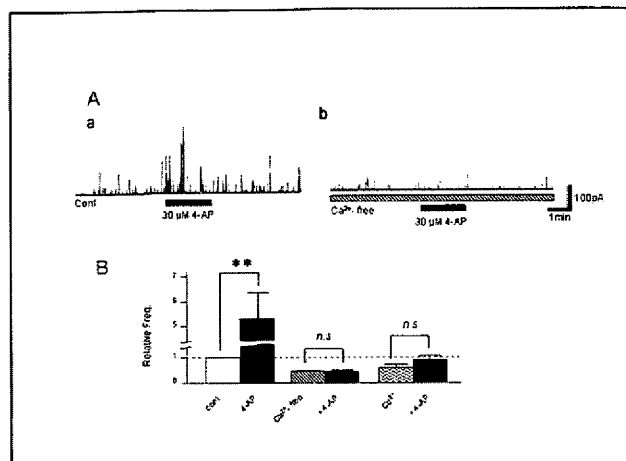


図2 mIPSC への無 Ca^{2+} 外液と Cd^{2+} の効果

Aa: $30 \mu\text{M}$ 4-AP を加えたときの mIPSC の変化。

Ab: 無 Ca^{2+} 溶液下に $30 \mu\text{M}$ 4-AP を加えたときの mIPSC の変化。

B: 無 Ca^{2+} 外液や Cd^{2+} 存在時の mIPSC の頻度変化。(4-AP $n=9$, Ca^{2+} -free $n=4$, Cd^{2+} $n=5$)

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$,

n.s 有意差なし。

が Gly 作動性の mIPSC の発生に関与することがわかった。

3. Ca^{2+} チャンネル阻害剤の mIPSC への作用

Gly 放出に関与する Ca^{2+} チャンネルサブタイプを明らかにするため、 Ca^{2+} チャンネルのサブタイプの L 型阻害剤である nifedipine (Nif), P/Q 型阻害剤である ω -agatoxin IVA (AgTX) 及び N 型阻害剤の ω -conotoxin GVIA (CgTX) を用いての実験結果を図 3 に示す。それぞれ 4-AP と同時に作用させたところ、4-AP 単独での作用と比較して mIPSC 頻度の増加が有意差をもって減少した。この結果より K^+ チャンネル阻害による脱分極で開口する神経終末部の Ca^{2+} チャンネルは L 型、P/Q 型および N 型サブタイプであると薬理学的に結論された。

4. 細胞内 Ca^{2+} で活性化される K^+ チャンネルへの阻害剤効果

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって開口する K^+ チャンネルがある。これら K^+ チャンネルの選択的阻害剤を作用させて得られた結果を図 4 に示す。これらの K^+ チャンネルはその単一チャンネルコンダクタンスの大きさから、BK チャンネル、IK チャンネルおよび SK チャンネルの 3 種類に分類される。大きなコンダクタンスを持つ BK チャンネルは iberiotoxin (IbeTX) に

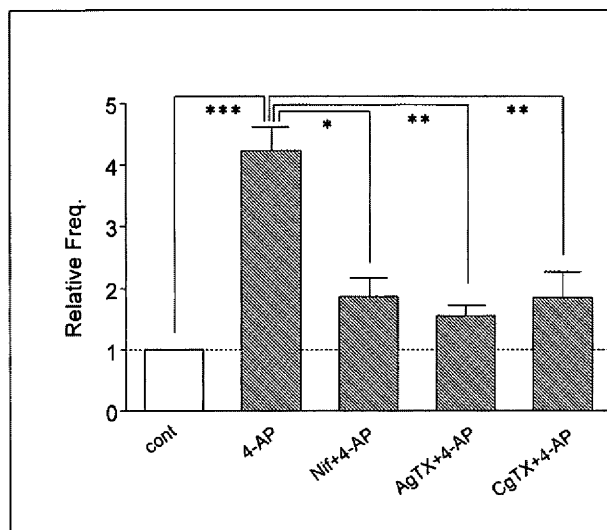


図3 4-AP による mIPSC 頻度増加に対する選択的 Ca^{2+} 拮抗薬の抑制作用。ヒストグラムは mIPSC の平均発生頻度を示す ($n = 4 \sim 7$)。

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$,

n.s 有意差なし。

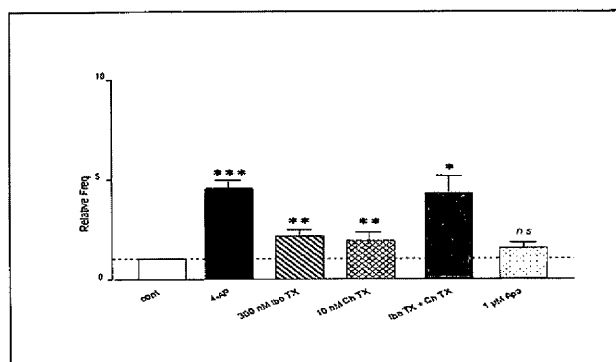


図4 細胞内 Ca^{2+} で賦活される各種 K^+ チャンネルへの選択的阻害剤による mIPSC の平均頻度。

IbeTX, $n = 6$; ChTX, $n = 6$; IbeTX + ChTX, $n = 5$; Apa, $n = 5$ 。

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$,

n.s 有意差なし。

よって、中間のコンダクタンスの IK チャンネルは charybdotoxin (ChTX)、小さいコンダクタンスの SK チャンネルは apamin (Apa) によってそれぞれ阻害される。 300nM IbeTX と 10nM ChTX では mIPSCs の頻度の増加が確認されたが、 $1 \mu\text{M}$ Apa では有意に増加しなかった。いずれも振幅には変化がなかった。また IbeTX と ChTX を同時に添加したところ、さらに頻度の増加がみられた。したがって神経終末部には細胞内 Ca^{2+} の増加によって賦活される BK チャンネル、IK チャンネルが存在することが

わかった

Ⅳ. ま と め

1. K^+ チャネル阻害剤の4-APによる神経終末部の脱分極によりL型, P/Q型およびN型 Ca^{2+} チャネルが開口し, 細胞内に Ca^{2+} が流入する。
2. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化する K^+ チャネルには, BKチャネルとIKチャネルがある。

Ⅴ. 謝 辞

本実験の遂行にあたり, ご指導をいただいた本学 赤池紀生教授に深謝致します。

Ⅵ. 文 献

- 1) Akaike N & Harata N : Nystatin perforated patch recording and its application to analysis of intracellular mechanism. Jpn J Physiol. 44: 433-473, 1994.
- 2) Nakamura M, Jang IS, Ishibashi H et al.: Possible roles of kainate receptors on GABAergic nerve terminals projecting to rat substantia nigra dopaminergic neurons. J Neurophysiol. 90 (3) : 1662-70, 2003.
- 3) Murakami M, Isibashi H, Katurabayashi S et al.: Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. Brain Res. 951 (1) : 121-9, 2002.

(平成18年1月16日受理)

野中喜久, 正代清光, 前田 恵

〒861-5598 熊本市和泉町亀の甲325番地

熊本保健科学大学

保健科学部 衛生技術学科

Contribution of Ca Channels on Glycine Release from Nerve Endings

Kiku NONAKA, Kiyomitsu SHOUDAI, Megumi MAEDA

Abstract

In the presence of selective Ca^{2+} channel blockers of L-type, P/Q-type and N-type, the slow depolarization of nerve endings induced by K^{+} channel blockers failed to increase the frequency of spontaneous glycinergic inhibitory postsynaptic currents (mIPSC). The results indicate that the glycinergic nerve endings have the high-threshold Ca^{2+} channels such as L-, P/Q- and N-types. In addition, the intracellular Ca^{2+} -sensitive K^{+} channels such as BK and IK also existed in the glycinergic nerve endings.