

グリシン作動性神経終末部からの Gly 遊離への Sr^{2+} の効果

前田 恵 正代 清光 野中 喜久

神経終末内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加がシナプスからの伝達物質放出を惹起することはよく知られている。しかし、哺乳類の中樞神経系シナプスからの伝達物質放出において、他の2価陽イオンであるストロンチウム (Sr^{2+}) が Ca^{2+} 同様の機能を有するか否かは不明である。従って、我々はラットの脊髄背側交連核 (SDCN) ニューロンの‘シナプス・ブートン’標本を使用して、 Sr^{2+} が Ca^{2+} のようにグリシン (Gly) 作動性の神経終末部からの自発的グリシン放出にどう影響するのかを、抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を指標にして電気生理学的に検討した。

その結果、中枢神経の神経終末部において、 Sr^{2+} は L 型 Ca^{2+} チャネルを通過し、この流入した Sr^{2+} が Ca^{2+} とほぼ同様な働きをして Gly 放出に関与していることを明らかにした。

キーワード：‘シナプス・ブートン’標本、神経終末、グリシン (Gly)、 Ca^{2+} チャネル、ストロンチウム (Sr^{2+})

I はじめに

神経終末からの化学伝達物質の遊離は、シナプス前膜の脱分極に依存した Ca^{2+} チャネルの開口による細胞内への Ca^{2+} 流入で惹起される。すなわち、電位依存性の Na^+ チャネルがまず開き、これにトリガーされて閾値の高い Ca^{2+} チャネルが開口し、 Ca^{2+} が流入する。 Ca^{2+} が細胞外から細胞内へ流入することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が上昇し、伝達物質の放出につながる。

電位依存性 Ca^{2+} チャネルには、脱分極にて持続的にチャネルが開口する高閾値 (HVA) Ca^{2+} チャネル (L, N, P, Q, R 型) と、わずかの脱分極で一過性にチャネルが開口する低閾値 (LVA) Ca^{2+} チャネルがある¹⁾。後者は T 型 Ca^{2+} チャネルとも呼ばれている。

心筋細胞では薬物やイオンで区別できる fast channel と slow channel と呼ばれる遅速2種類の内向き電流を通過させるイオンチャネルの存在が知られている。そのうち slow channel では、2価陽イオンのストロンチウム (Sr^{2+}) やバリウム (Ba^{2+}) が、 Ca^{2+} 以上にこのチャネルを通過し、 Ca^{2+} と同じ働き (収縮の惹起等) をすることが知られている²⁾。稲沢ら³⁾ はモルモット心筋の slow channel 開口に依存する活動電位発生時の2価陽イオン透過性

の順序は、 Ca^{2+} チャネルのサブタイプの1つL型で、 $I_{\text{Ba}} \geq I_{\text{Sr}} \gg I_{\text{Ca}}$ であると報告している。しかし、哺乳類中枢神経終末部からの化学伝達物質遊離には、 Ca^{2+} の代わりに他の2価陽イオンがどのように係わり合っているかについては報告がない。そこで、本実験では、膀胱、子宮や大腸からの内臓痛覚を中継をするラット SDCN ニューロンの‘シナプス・ブートン’標本を使用して、2価陽イオンの Sr^{2+} が Ca^{2+} と比較して神経終末からの Gly 放出にどのような影響を与えるのかを、Gly の放出によって惹起される mIPSC を指標にして電気生理学的に検討した。なお、‘シナプス・ブートン’標本とは、機械的処理のみで単離した中枢ニューロンのことで、この単離ニューロンには興奮性のグルタミン酸 (Glu) 作動性や抑制性の Gly 及び GABA 作動性神経終末部が正常生理機能を保持したままで多数付着している。

II 実験方法

生後10~16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、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浸漬し、マイクロスライサーで厚さ400 μm の脊髄薄切片 (スライス) 標本を作製した。ス

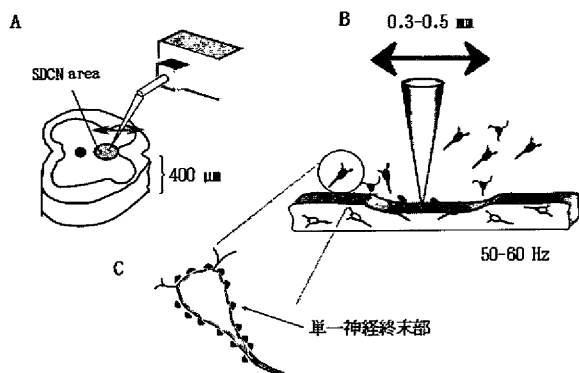


図1 SDCNニューロンの‘シナプス・ブートン’標本作製の模式図

A, SDCN領域を含む脊髄薄切片へ、ガラス管先端で機械的振動を与える。B, Aの振動するガラス管先端部分。小さな赤点は振動で単離され飛び出すSDCNニューロンを示す。C, 単離後のSDCNニューロンに付着する沢山の単一神経終末部（青点）。

ライス標本は室温のインキュベーション溶液中に1時間放置して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、その表面に先端を丸くした直径数 μm の微小ガラスピペットを接触させ、その先端部に0.3~0.5mmの振幅で50~60Hzの機械的振動を与えることにより、SDCNニューロンの‘シナプス・ブートン’標本作製した（図1）。シナプス下膜にあたるSDCNニューロンにホールセルパッチクランプ記録法を適用し、室温で膜電位を0 mV ($V_h = 0$ mV)に固定下、微小神経終末部からの自発的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、シナプス前神経終末部への Sr^{2+} の影響を間接的に検討した。なお、Gly放出のみによるmIPSCを観察するために、シナプス後膜上（SDCN細胞体）のGluやGABAの受容体を薬理的に抑制して実験を遂行した。Gluのカイニン酸及びAMPA受容体を阻害するにはCNQX, GluのNMDA受容体の阻害にはAP-5を、 GABA_A 受容体の阻害剤としてビククリンを用いた。さらに Na^+ チャネルの選択的阻害剤であるテトロドトキシンを用い活動電位の発生で誘起されるeIPSCを完全に抑制し、自発性に遊離されるGlyで発生するmIPSCのみを記録した。

なお、用いた動物の取り扱いは本学の「動物実験

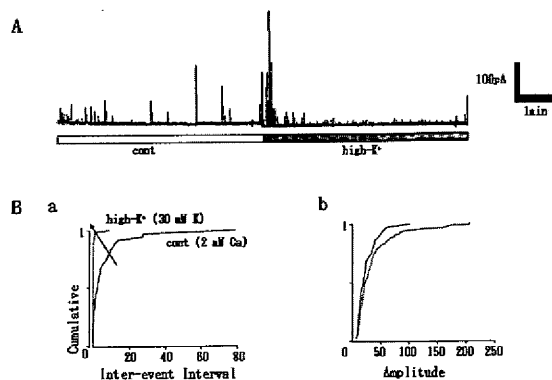


図2 自発性のGly放出で惹起される抑制性シナプス後電流（mIPSC）

A, 高 $[\text{K}^+]_o$ によるmIPSCの一過性の増加。

B, 高 $[\text{K}^+]_o$ によって増加したmIPSCの頻度（a）と変化しない電流振幅（b）。

図AにおいてmIPSCの電流の大きさが大きくなったように見えるが、これは沢山のmIPSCが加重され、みかけ上電流の振幅が大きくなっている。

における実験処置に対する倫理基準」に従った。

Ⅲ 結 果

1. 高濃度の外液 K^+ ($[\text{K}^+]_o$) の効果

高 $[\text{K}^+]_o$ の添加によって神経終末部の脱分極を起こすために、外液中 $[\text{K}^+]_o$ を正常液中の5 mMから30mMへと増加させた時のmIPSCの一過性の増加を図2 Aに示す。その時のmIPSCの頻度の増加と電流の大きさ（振幅）への影響を解析したのが図2 B a, bである。図から明らかなようにmIPSCの頻度は著しく増加したが、振幅には有意差は見られなかった。このことは高 $[\text{K}^+]_o$ の作用点がシナプス前終末部の脱分極であり、シナプス後膜部ではないことを示唆する。

2. 外液 Sr^{2+} ($[\text{Sr}^{2+}]_o$) の効果

正常外液中の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) は2 mMであるが、外液中の Ca^{2+} を除去するためEGTAを含む無 Ca^{2+} の外液を作製した。引続き無 Ca^{2+} 外液と置換して長時間維持し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を経時的に減少させた後、 Sr^{2+} を含む外液を作用させると、図3 Aに見られるようにmIPSC頻度の増加が見られた。これは Ca^{2+} が外液中に存在する時と同じであった。さらに Sr^{2+} 存在下に30mM高 $[\text{K}^+]_o$ を加えるとmIPSC頻度のさらなる増加が見られたが、この場

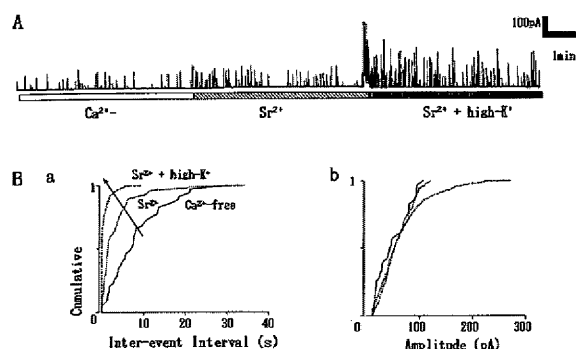


図3 $[\text{Sr}^{2+}]_0$ の mIPSC への効果

- A, Sr^{2+} , Sr^{2+} と高 $[\text{K}^+]_0$ 外液の mIPSC への効果。
B, 無 Ca^{2+} 外液中, Sr^{2+} , Sr^{2+} と高 $[\text{K}^+]_0$ によって増加した mIPSC の頻度 (a) と変化しない電流振幅 (b)。

合も電流の振幅には影響を与えなかった (図3 B a, b)。

3. mIPSC 下降相キネティクスへの Sr^{2+} 作用

記録された mIPSC の10トレース全ての電流の振幅の大きさを1つにまとめ、平均化したものが図4 A, B である。チャネル閉口時の時間経過が、速い成分と遅い成分の2つの指数関数からなることがわかる。 Sr^{2+} は速い成分に関しては Ca^{2+} と変わらないが、遅い成分に対してはわずかながら延長させる傾向を示した (図4 C)。

IV 考 察

これまでの我々の研究で Gly の mIPSC の発生に関与するのは L 型 Ca^{2+} チャネルの開閉による細胞内への Ca^{2+} の流入が主であったことが分かっている^{4,5)}。今回我々は、高 $[\text{K}^+]_0$ を加えることにより、mIPSC の頻度が増加すること、この増加は外液中の Ca^{2+} の除去によって消失することを確認した。これらの結果から、高 $[\text{K}^+]_0$ を加えたことによる神経終末部の脱分極の結果、 Ca^{2+} チャネルが開閉し、流入した Ca^{2+} が伝達物質である Gly の放出を起こしていると考えられる。

また、無 Ca^{2+} 液中に Sr^{2+} のみを添加した時、mIPSC 頻度が増加したことから、心筋細胞の場合

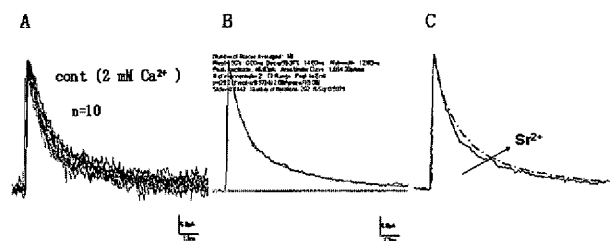


図4 mIPSC 下降相キネティクスへの Sr^{2+} 作用

- A, 記録された mIPSC の10トレース全ての波形の電流の振幅の大きさを平均化したもの。
B, A を平均化した波形で理論曲線のコンピュータフィット。
C, $2\text{mM}\text{Ca}^{2+}$ と Sr^{2+} のチャネル閉口時の時間経過を比較したもの。遅い下降相が遅延していることに注目。

と同様に中枢神経の神経終末部においても Sr^{2+} が L 型 Ca^{2+} チャネルを通過し、この流入した Sr^{2+} が Ca^{2+} と同等の働きをして Gly 放出に関与したと考えられる。

電流下降相のキネティクス解析での Ca^{2+} と Sr^{2+} の役割を比較すると、 Sr^{2+} は mIPSC 下降相の速い減衰成分に関しては Ca^{2+} と変わらないが、遅い成分ではグラフが右側にシフトしていたこと (図4 C) から、開口した Gly チャネルがもとの状態 (チャネルが閉口した状態) に戻るのがやや遅くなっていることを示している。このことは、神経終末部における Sr^{2+} の流入が Ca^{2+} 流入よりも大きいことを示し、Gly 放出に関して、 Sr^{2+} が Ca^{2+} よりも多少強力ということを示唆する。

V 謝 辞

本研究にあたり、ご指導を頂いた衛生技術学科生命科学研究部門の赤池紀生教授に感謝の意を表します。

VI 参考文献

- 1) Murakami N, Ishibashi H, Katsurabayashi S & Akaike N: Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting

- to rat hippocampal neurons. Brain Res. 951 : 121–129, 2002.
- 2) 後藤昌義：心臓の生理. 南江堂, 49–60, 1984.
- 3) 稲沢 実：K 脱分極モルモット心室筋における二価陽イオン依存性活動電位の特性について. 福岡医学雑誌, 73 : 711–725, 1982.
- 4) Michiko Nakamura, Il-Sung Jang, Hitoshi Ishibashi, Shigenori Watanabe and Norio Akaike : Possible roles of kainate receptors on GABAergic nerve terminals projecting to rat substantia nigra dopaminergic neurons. Neurosci. Res. 42 : 187–195, 2002.
- 5) Kiku Nonaka, Megumi Maeda, Kiyomitsu Shoudai, and Norio Akaike : Multiple K⁺channel subtypes modulate glycine release at sacral dorsal commissural neurons. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences and Cardiac and Smooth Muscles. Abstracts, 53, 2005.
(平成18年1月16日受理)
- 前田 恵, 正代清光, 野中喜久
〒861–5598 熊本市和泉町325番地
熊本保健科学大学
保健科学部 衛生技術学科

Effect of Sr^{2+} on Spontaneous Glycine Release from the Glycinergic Nerve Terminals

Megumi MAEDA, Kiyomitsu SHOUDAI, Kiku NONAKA

Abstract

It is well known that Ca ions activate the exocytotic release of transmitters from synapses. However, the functional role of Sr^{2+} in the transmitter release from mammalian CNS synapses remains unclear. Thus, we did direct electrophysiological observation how this divalent cation (Sr^{2+}) affects the spontaneous glycine release from the nerve terminals using 'synaptic bouton' preparation of rat spinal sacral dorsal commissural nucleus (SDCN) neurons.

It was concluded that Sr ions could pass through L-type Ca^{2+} channel into the CNS neuron and activated Gly release from the nerve terminal as well as Ca ions.