1PA073

アメフラシ摂食神経回路網内 MA1、MA2 ニューロンに見られるカルシウムチャンネル分布、および神経伝達物質応答性の相違
○岩本章¹、吉田竜介¹、長濱辰文² (¹神戸大・院・自然科学、²神戸大・理・生物)

アメフラシの口球神経節には、摂食に関して 1 個で premotor、motor、sensory neuron の働きを示す多機能ニューロンが存在し、これを MA1 ニューロンと呼んでいる。MA1 は同側の n3 神経束へ軸索を伸ばしており、口球神経節の左右にそれぞれ 3 個ずつの細胞体が存在する。一方、口球神経節の左右に 1 個ずつ存在する MA2 ニューロンは、同側の n3 神経束手前で軸索が途切れているが、中枢内での閉口ニューロン (JC) 等に対するシナプス効果や、摂食時の放電パターンは MA1 に酷似している。そこで MA2 は「軸索にダメージを受けた MA1 ニューロン」である可能性も示唆されていた。本研究では、これら MA1、MA2 ニューロンのイオンチャンネルの分布や神経伝達物質に対する応答性を比較し、これらニューロンの機能的差異の存在の可能性を探る事を目的とした。

【実験】我々は既にカルシウムイメージング法を用い、ニューロンのスパイク発生に伴い細胞内カルシウムイオン濃度が増大する事、これはほとんどが細胞外からの流入による事などを報告している。そこでこの方法を用い、種々の電位依存性カルシウムチャンネルの阻害剤 (T タイプ、Amiloride; L タイプ、Nifedipine; N タイプ、 ω -conotoxin; P タイプ、 ω -agatoxin) 存在下で MA1、MA2 を発火させ、神経細胞体、軸索、樹状突起におけるカルシウムイオン流入量を調べた。また、細胞外液に種々の神経伝達物質 (Acetylcholin, Glutamate, Serotonin, Dopamine) を添加し、これらニューロンの膜電位応答を調べた。さらに微小ピペットを用いた電気泳動的方法により伝達物質を局所投与した時の応答も比較した。

【結果及び考察】Nifedipine 存在下、MA1 では神経細胞体、MA2 では軸索におけるカルシウムイオンの流入が抑制され、L タイプカルシウムチャンネルの分布に差が見られた。また、MA2 の軸索末端部は Amiloride 存在下でカルシウムイオン流入が抑制され、T タイプカルシウムチャンネルの局在も見られた。一方、細胞外液に Serotonin を加えた場合、MA1 では過分極を、MA2 では一過性の過分極の後に脱分極を誘発するなど異なる膜電位変化を起こした。以上の結果、MA1 と MA2 はカルシウムチャンネルの分布、神経伝達物質に対する応答性に差が見られ、摂食神経回路網内で異なる役割分担をしている可能性が示唆された。

A. Iwamoto, R. Yoshida, T. Nagahama : Differences in localization of calcium channels and responses induced by neurotransmitters between MA1 and MA2 neurons in *Aplysia* feeding neural network.

1PA075

カエル神経筋接合部シナプス前末端における Ca^{2+} 動態と可塑性
○村瀬雅樹、伊藤幸民、鈴木慎一、加沢知毅、鈴木直哉、木島博正 (名古屋理学研究科物質物理学(物理))

カエル神経筋接合部では、 Ca^{2+} 蛍光指示薬をシナプス前末端へ負荷することにより神経刺激後の末端内 Ca^{2+} 濃度の測定がなされ、以下のことが分かっている。

- ・一回刺激、100 Hz 10 回刺激後に 100ms 以下の時定数を持つ急速な平均 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰が存在する
- ・一回刺激後、蛍光がピークに達するまでに 10ms 程度かかる

前年会までに、これらの結果を、

- ・活性面上の Ca^{2+} 流入部位から離れた部位における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の二乗に比例した除去機構(ミトコンドリアと考えられる。)
- ・活性帯面における一次のミカエリス・メンテン型ポンプによる排出

という空間的にヘテロなカルシウム除去機構を組み合わせたモデルを用いてシミュレーションを行い、説明した。

最近になり、定量されたカルシウムキレーター(EGTA, BAPTA, Oregon Green 488 BAPTA-1)の存在下で、10 回刺激後の末端内の平均 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、および電気生理実験による促進成分の測定がなされた。

これによると、数百 ms から数秒の時定数で減衰する遅い成分が大きな割合を占めることが明らかになったが、これまでのモデルでは遅い成分を十分に説明することができなかった。そこで、今回は、ミトコンドリアからの再放出や、固定バッファの局在などの修正モデルを検討する。

また、電気生理実験の結果から、キネティクスの異なる Ca^{2+} キレーターが促進に与える影響について詳細が分かったので、修正モデルの範囲内で伝達物質放出機構の解明を試みる。

M. Murase, K. Ito, S. Suzuki, T. Kazawa, N. Suzuki, H. Kijima : Computer simulation of free Ca^{2+} and synaptic plasticity at the presynaptic terminal of frog neuromuscular junction

1PA074

ω -Conotoxin が Ca^{2+} 非存在下での連続刺激による自発放出頻度増大を抑制する

○鈴木 直哉、林 依佐子、鈴木 慎一、木島 博正 (名古屋・理学・物理)

カエル神経筋接合部シナプスにおいて、 Ca^{2+} 非存在下 (1 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , pH7.4) で 100Hz 5000 発の連続刺激を行うと自発放出頻度 (mEPP 頻度) が数十倍に増加する。そして、この mEPP 頻度増大は、連続刺激後にゆっくりと 2 相性に (減衰時定数約 15 秒と 100 秒) 連続刺激前のレベルに戻ってゆく (Tanabe & Kijima, J. Phys. 455 271-289, 1992)。この条件下では、外液の遊離 Ca^{2+} の濃度は 1 nM 程度であり、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開いても外からの Ca^{2+} 流入は考えられない。実際、この条件下でのシナプス前末端内 Ca^{2+} 濃度測定を行ったが、連続刺激中に Ca^{2+} 濃度上昇は見られなかった。ところが、N タイプ Ca^{2+} チャンネルの阻害剤である ω -Conotoxin GVIA 還流下では、この mEPP 頻度増大が著しく抑制され、数倍程度にしかならなかった。2 価カチオンフリーでは、 Ca^{2+} チャンネルは Na^+ をよく通すことが知られているが、5 mM Mg^{2+} が存在するこの条件下では、 Na^+ 流入は考えにくい。この結果は、 Ca^{2+} や Na^+ 流入でなく、N タイプ Ca^{2+} チャンネルの ω -Conotoxin sensitive な電位依存性の構造変化そのものが放出装置を活性化し得ることを示唆している。発表では、N タイプ Ca^{2+} チャンネルの可逆な阻害剤である ω -Conotoxin MVI A の効果や、 Co^{2+} や Cd^{2+} 等の Ca^{2+} チャンネル阻害剤の効果、シナプス前末端内 Na^+ 濃度測定の結果等についても報告する予定である。

N. Suzuki, I. Hayashi, S. Suzuki, H. Kijima : ω -conotoxin GVIA reduces the stimulation induced enhancement of MEPP frequency in a Ca^{2+} free condition.

1PA076

カエルの神経筋接合部シナプス前末端における細胞質内とミトコンドリアの Ca^{2+} 動態

○鈴木 慎一 鈴木 直哉 村瀬雅樹 木島 博正 (名古屋大学理学部物理学科)

われわれはカエル胸筋の神経筋接合部シナプスの前末端に Ca^{2+} 蛍光指示薬である Indo-1 や Oregon Green を負荷し、高速共焦点顕微鏡等を用いた神経刺激時、刺激終了後の前末端内 Ca^{2+} 動態を主にビデオレートでの観測を測定している。連続刺激後に前末端内 Ca^{2+} 濃度は速やかに減少する。(時定数 $\leq 100\text{ms}$) ラットの中枢神経系やザリガニの神経筋接合部で観測されている数秒の時定数のものと比べるとかなり速いこの減衰は、高能率の Ca^{2+} 排除機構の存在を示唆している。

この Ca^{2+} 排除機構として何がメインかを薬理的に調べた結果、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みのみを効率的に阻害するオリゴマイシンとロネノンの同時投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度の減衰が劇的にゆっくりとなった。この結果は、同じくミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みを阻害する CCCP の投与による結果とほぼ同じである。このことからミトコンドリアが急激な Ca^{2+} 排除機構としての主な役割を果たしていると思われる。

今回我々は dihydro-rhod-2 を用いた染色により Ca^{2+} 蛍光指示薬である rhod-2 のミトコンドリアへの負荷に成功した。これにより得られた結果では 100Hz 100 回刺激などの高頻度複数回刺激を加えた場合、刺激開始より若干遅れて ($\sim 0.2\text{s}$) ミトコンドリア内の遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇、刺激終了後も細胞質内のように速やかには下がらず、緩やかに減衰する事が分かった。

今回は細胞質内とミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度の変化がどのように関連するかを蛍光指示薬から得られたそれぞれのデータをあわせて考える。

S. Suzuki, N. Suzuki, M. Murase, H. Kijima : Cytoplasmic and mitochondrial calcium dynamics in the presynaptic nerve terminal of the frog neuromuscular junction