3L1100

神経前末端における、神経ペプチドとアセチルコリン放出機構のカルシウム依存性の違い

○大沼 清¹、Whim Matthew D²、Fetter Richard¹、Kaczmarek Leonard K³、Zucker Robert S¹ (¹Dept. of Molecular & Cell Biol., UC Berkeley、²Dept. of Pharmacology, Univ. of College London、³Dept. of Pharmacology, Yale Med. Sch.)

神経ペプチドは中枢神経系も含め広く分布しているが、良い実験系が少なく研究は遅れている。神経ペプチドはアセチルコリンなどの古典的な神経伝達物質と同じ末端より放出されるものもあるが、シナプス小胞とは別の有芯顆粒に蓄えられている。両方とも神経前末端でのカルシウム濃度に応じて放出されるが、その様式が異なることが知られている。アメフラシ (aplysia, californica) の B 2 神経細胞は B3 細胞と共培養するとアセチルコリン型、感覚細胞と共培養するとペプチド型のシナプスが形成される。これは単一の活動電位で伝達を確認されている、大変特徴的なペプチド型シナプスである。これら 2 つの異なる放出機構のカルシウム依存性を調べるため、ケージドカルシウム剤 (NP - EGTA) を使用し、シナプス前末端内のカルシウム濃度を瞬間的に上昇したときのシナプス伝達を、それぞれのシナプスに関して定量した。ペプチドとアセチルコリンの放出量は、それぞれカルシウム濃度の 2 乗、3 乗に比例していた。この結果より、カルシウム結合サイトにカルシウムが 2、3 個結合することが示唆された。また、ペプチドとアセチルコリンの放出を誘起する最低カルシウム濃度はそれぞれ $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ であった。このことより、ペプチドは寄り低いカルシウム濃度で放出が起こることがわかる。さらに、1 回の活動電位で誘起される、放出のトリガー部位でのカルシウム濃度は、ペプチド型シナプスでは $9 \mu\text{M}$ 、アセチルコリン型シナプスでは $23 \mu\text{M}$ であった。従って、ペプチドを含む小胞はアセチルコリンを含む小胞に比べ、カルシウムチャネルからより遠い所にあることが示唆された。電顕実験より、シナプス結合の部位の 74% が、シナプス膜に結合したペプチドを含む有芯顆粒を少なくとも 1 つ持つことが示された。さらに、有芯顆粒の活性帯も見つかった。

K.Ohnuma, M.D.Whim, R.Fetter, L.K.Kaczmarek and R.S.Zucker : Presynaptic target of calcium action on neuropeptide and acetylcholine release

3L1130

カプサイシン受容体 VR1 のプロトン作用部位の同定

○富永 真琴 (筑波大・基礎医・分子神経生物)

プロトンはカプサイシンや熱と同様にカプサイシン受容体 VR1 を活性化させて感覚神経興奮をもたらす痛みを惹起する。弱い酸性化 (pH 6.0~) では VR1 のカプサイシンあるいは熱活性化電流は増大し、強い酸性化 (~pH 6.0) では酸性化のみで VR1 は活性化する。プロトンによる VR1 活性化の EC₅₀ が室温で約 pH 5.4 であること、プロトンが細胞外からのみ作用することから VR1 の細胞外ドメインの酸性アミノ酸の点変異体を作成して機能解析を行いプロトンの作用部位を検討した。VR1 の第 3 細胞外ループのグルタミン酸 (E600) を中性アミノ酸に置換するとプロトンによる VR1 活性化に大きな変化はなかったが、プロトンによるカプサイシンもしくは熱活性化電流の制御作用は消失しカプサイシンあるいは熱活性化電流は prepotentiate されたように大きな値を示した。また、E600 を異なる pK 値のアミノ酸に置換すると、プロトンによる VR1 活性化の pH 依存曲線は pK 値の変化に平行にシフトした。更に、別の酸性アミノ酸の変異体では、プロトンによる VR1 活性の制御機構に変化はなくプロトンによる活性化が減弱した。以上の結果は、プロトンによる VR1 の活性化と制御が異なる機構によるものであることを示唆するとともに、E600 が後者の機構に重要な部位であることを示す。

M. Tominaga : Acid potentiation of the capsaicin receptor, VR1 determined by a key extracellular site

3L1115

海馬ニューロンの NMDA 受容体を介したカルシウム信号に対するグルココルチコイドの急性効果

○高橋 泰城、木本 哲也、高田 則雄、川戸 佳 (東大・院・生命物理)

近年、ラットをもちいた研究で、さまざまなステロイドが空間的な記憶学習能に影響することが分かってきたが、その神経機構には未知のことが多い。その解明のため、我々はステロイドが神経細胞の Ca 信号、NO 信号を制御する機構や、それによる神経細胞の機能変化について研究している。海馬ニューロンの NMDA 受容体は、グルタミン酸の結合によって Ca を流入させ、長期増強をひきおこし、これが空間的な記憶・学習の神経機構であると考えられている。神経ステロイドの一種、硫酸プレグネノロンは、20 分の急性インキュベーションにより NMDA 受容体の Ca 流入量を瞬間的に増やすが、1 分程度で細胞内 Ca 濃度はもとの低い状態に戻る。一方、ストレスステロイドのコルチコステロンは、20 分の急性インキュベーションにより、NMDA 刺激によって誘起されるカルシウム濃度上昇を高い値に固定してしまうことが分かった。この高濃度 Ca により、神経細胞のミトコンドリアの膜電位差が失われ、神経細胞にダメージを与えてしまうことがわかった。また、このコルチコステロンの効果は、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミドでも消失しなかったのでコルチコステロンが NMDA 受容体を介した Ca を急性的に制御していることが確かめられた。電位感受性 Ca チャンネルをニカルジピンで阻害したり、細胞内 Ca ストアをタブシガルジンで枯渇させたりしてもこの効果は消失しなかったので、コルチコステロンが NMDA 受容体に作用している可能性が高い。生後 3~4 日のラット脳より調整した海馬ニューロンに fura-2 や rhodamine123 を負荷し、Ca 信号、ミトコンドリア膜電位を顕微イメージングにより解析した。コルチゾールやデキサメサゾンなどほかのグルココルチコイドの効果についても報告する。

T. Takahashi, T. Kimoto, N. Takata and S. Kawato : acute effects of glucocorticoids on NMDA-induced Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons

3L1145

表皮組織中のイオンの移動によって形成される皮膚表面電位

○傳田 光洋¹、芦田 豊¹、井上 かおり¹、熊沢 紀之² (¹資生堂研究所、²茨城大・工)

汗腺のないヘアレスマウスの皮膚切片の組織培養系で、皮膚表面電位と表皮中のイオンの動きとの関連を調べた。培地を基準にした場合、皮膚表面には -3 mV 程度の電位が観察された。この電位差は アジ化ナトリウム、カルモジュリン阻害剤 (Trifluoperazine, Amitriptyline)、Na⁺/K⁺ ATPase 阻害剤 (Ouabain) によって約 70% 減衰した。これらの結果は皮膚電位が、主として表皮細胞のエネルギー消費性の活動に由来することを示している。またカルシウム、カリウム、ナトリウムチャネルブロッカー (Verapamil, Nifedipine, Aminopyridine, Tetrodotoxine) によっても電位差は減衰した。そしてカリウムイオノフォア (Valinomycin)、およびカルシウム特異性イオノフォア (Ionomycin) は電位差を減衰させたが、カルシウムとマグネシウムのイオノフォアである A23187 は電位差を増加させた。また EGTA は電位差を減衰させたが、EDTA は電位差を増加させる傾向を示した。これらの結果は表皮細胞内外のイオンの動き、特にカルシウムとマグネシウムの相対的な濃度分布が、皮膚表面電位差の形成に重要であることを示している。さらに CRF、およびサブスタンス P も皮膚電位差を減衰させ、これらのアンタゴニストがその減衰をブロックしたことから、内分泌系や神経由来の変化が皮膚電位に影響を及ぼすことも示唆された。またセロテープで皮膚表面のバリアーである角質層を剥がすと、皮膚電位差が減衰すること、そしてこの減衰が 30% 程度、カルシウムチャネルブロッカー、カリウムチャネルブロッカーで抑制されること、ナトリウムチャネルブロッカーは影響しないことも確認された。これらの結果は皮膚バリアーの障害のシグナル伝達にもカルシウムイオンやカリウムイオンの動きが寄与していることを示している。

M.Denda, Y.Ashida, K.Inoue, N.Kumazawa : Skin surface electric potential induced by ion flux in the epidermis