

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 Developmental Changes in Sodium and Potassium Conductance Underlying Action Potentials in the Giant Nerve Terminal of Rat Auditory Brainstem

和訳 ラット脳幹巨大聴覚中継神経終末端の活動電位を形成する Na⁺、K⁺コンダクタンスの生後発達変化

指導教員 高橋智幸教授

東京大学大学院医学系研究科
平成14年4月入学

医学博士課程
機能生物学専攻
氏名 中村行宏

活動電位は、電位依存性 Na チャネルの活性化によって誘発され、Na チャネルの不活性化とそれに伴う電位依存性 K チャネルの活性化によって終息する。活動電位の高さや幅、発生頻度はこれらチャネルの密度やキネティクスによって規定される。脳幹の聴覚中継核である台形体内側核に存在するヘルドの巨大シナプス (calyx of Held) は数百ヘルツ以上の高頻度入力に対応できる。この高頻度入力に対応する高信頼性シナプス伝達は動物の音源定位に必須であり、齧歯類では生後2週齢で確立される。この生後機能発達の過程でシナプス前終末の活動電位の幅がおよそ 1/2 に短縮することが知られていたが、そのイオン機構は明らかにされていなかった。本論文では、活動電位変化の要因となるシナプス前 Na⁺ および K⁺電流を記録し、その生後発達変化を検討した。

生後 7-8 (P7-8) および 13-15 (P13-15) 日齢ラットより脳幹スライスを作製し、calyx

of Held シナプス前末端の電流および電位をパッチクランプ法により記録した。

シナプス前末端の Na⁺電流を whole-cell mode で記録した。電流密度と電流活性化・不活性化の電位依存性に変化は認められなかったが、P7-8 から P13-15 にかけて電流不活性化の時間が 1/2 へ短縮した。

シナプス前末端より whole-cell mode で記録した K⁺電流は、P7-8 から P13-15 にかけて電流密度が 2 倍に増加するとともに、電流活性化の時間が 2/3 に短縮した。シナプス前末端由来のパッチ膜から outside-out mode で記録した K⁺電流においても、電流密度の増加と電流活性化時間の短縮が認められた。この生後発達の期間を通じて、電流活性化の電位依存性は変化しなかった。

P13-15 の calyx of Held シナプス前 K⁺電流は主に、1 mM テトラエチルアンモニウム (TEA) 感受性の高電位作動性 Kv3 電流、margatoxin (MgTX) 感受性の低電位作動性 Kv1 電流、iberiotoxin (IbTX) 感受性の Ca²⁺依存性 BK 電流に分類される。これらの各 K⁺電流を TEA、MgTX、IbTX 投与によってそれぞれ抑制される成分の差電流として分離し、P7-8 と P13-15 で比較した。Kv3、Kv1 電流は発達に伴って電流密度が増加し、電流活性化時間も短縮した。全 K⁺電流に占める Kv3-Kv1 電流の比率は変化しなかった。一方、BK 電流には発達に伴う変化は見られなかった。シナプス前末端における K⁺電流密度の増加および活性化時間の短縮には、Kv3、Kv1 電流の両者の変化が貢献していることが示された。

K⁺電流の発達変化が活動電位幅の短縮に対して及ぼす作用を明らかにするために、入力線維刺激によって誘発される calyx of Held シナプス前末端の活動電位を記録し、K⁺チャネル阻害薬の作用を観察した。MgTX、IbTX は活動電位波形に対し作用を示さなかった。TEA は活動電位幅を延長し、その程度は P7-8 と P13-15 で同じであった。Kv3 電流は発達の期間を通して活動電位幅の短縮に貢献しうるが、発達に伴う活動電位幅の短縮は Kv3、Kv1 電流の変化だけでは説明できないことが示唆された。TEA (10 mM)、4-アミノピリジン、Cd²⁺投与によりシナプス前末端のすべての K⁺、Ca²⁺電流を阻害し活動電位を記録した。

Na⁺電流のみに依存するこの状態の活動電位波形は、P13-15 で P7-8 よりも短かった。従って活動電位幅の短縮は、生後発達に伴う Na⁺電流の不活性化時間の短縮にも依存することが示唆された。

活動電位幅に対する K⁺電流変化の作用のさらなる検討のため、神経細胞シミュレータ 'NEURON' を用い活動電位波形のシミュレーションを行った。Calyx of Held シナプス前末端より記録した P7 および P14 それぞれの K⁺電流を Hodgkin-Huxley 式に基づいてパラメータ化し、モデル細胞へ代入した。合成した P14 の活動電位に対し、K⁺電流の密度、K⁺電流の活性化キネティクス、Na⁺電流の不活性化のキネティクスを減少・低下させると、モデル細胞の活動電位幅は延長した。発達に伴う K⁺電流の密度増加、活性化時間短縮、Na⁺電流不活性化時間短縮のすべてが、活動電位幅の短縮に貢献することが示唆された。

次に、発達に伴う K⁺電流の増加が高頻度シナプス伝達の信頼性の上昇に貢献する可能性を検討した。シナプス前末端に軽度の持続的脱分極を与えると、P7-8 では脱分極期間中、活動電位が連続して発火したが、P13-15 前末端では発火は初めの数発にとどまった。Margatoxin は P7-8 では有意な作用を示さなかったが、P13-15 では活動電位の発火数を増加させた。この結果は、発達に伴う Kv1 電流の増加が神経終末端の興奮性を安定化し、異常発火の抑制に貢献していることを示唆する。次に、入力線維を 400Hz で刺激したところ、P13-15 前末端では活動電位の発火が入力刺激に完全に追従したが、P7-8 では活動電位の欠落が認められた。TEA (1 mM) を投与したところ、活動電位の追従性は P7-8 では変化しなかったが、P13-15 では活動電位発火が顕著に欠落した。これらの結果は発達に伴う Kv3 電流の増加が高頻度入力に対する高信頼性活動電位発火の確立に貢献することを示唆する。

以上の結果より、発達に伴う calyx of Held のシナプス前活動電位の短縮には、Na⁺電流不活性化時間の短縮、K⁺電流密度の増加および活性化時間の短縮のすべてが関与することが示唆された。またシナプス前末端における K⁺電流の増加は、高信頼性シナプス伝達の確立に重要な貢献をすることが明らかになった。