

論文の内容の要旨

| | |
|------|--|
| 論文題目 | Developmental changes in calcium/calmodulin-dependent inactivation of calcium current at the rat calyx of Held |
| 和訳 | ラットヘルドの前末端におけるカルシウム・カルモジュリン依存的カルシウム電流不活性化の生後発達変化 |
| 指導教員 | 狩野 方伸 教授 |

東京大学大学院医学系研究科
2003年4月入学
医学博士課程
機能生物学専攻
中村 健

カルモジュリン (CaM) へのカルシウムの結合はカルシウムチャネルの促通、あるいは不活化を引き起こす。最近 Xu らは P7-9 のラット脳幹スライスを用いた検討でヘルドの前末端において 1Hz 前後の繰り返し刺激によりプレシナプスのカルシウムチャネルがカルシウム・カルモジュリン依存的に不活化することを報告し、これが短期シナプス抑圧の主要な要因であると提唱している。しかし、高橋らの過去のデータでは P14-17 のヘルドの前末端においてそういった不活化は観察されていなかった。これらの相異はラットの発達に伴う変化により説明できる可能性が考えられたため、まず P7-9、および P13-15 のラット脳幹スライスを用いてシナプス前末端からの Ca 電流を記録し、2 回パルス刺激による Ca 電流の不活化を検討した。すると、P7-9 において 0.05-2s の刺激間隔において Ca 電流の不活化が見られ、この不活化は CaM 阻害薬であるカルミダゾリウム、MLCK ペプチドにより抑制された。一方、P13-15 においてはどの刺激間隔においても不活化が観察されず、これらの阻害薬も影響しなかった。従って、Xu らと高橋らのデータの相違はラットの発達に伴う変化によって説明できると考えられた。

次に、この CaM 依存的な Ca 電流不活化のシナプス抑圧への関与を検討するため、脳幹スライスのポストシナプスの細胞体から EPSC の記録を行った。0.5-5Hz の繰り返し刺激を行うと EPSC サイズは徐々に小さくなり、最終的には一定のサイズに到達し定常状態に至る。P7-9 の検討においてカルミダゾリウムはこのシナプスの短期抑圧を抑制したが、P13-15 においては特に影響を与えなかった。従って、Ca 電流の不活化のシナプス抑圧への関与も同様に発達に伴い消失していくと考えられた。

CaM 依存的な Ca 電流不活化が発達に伴い消失していくメカニズムにはいくつかの可能性が考えられた。1 つは発達に伴いプレシナプスにおける CaM の発現がダウンレギュレーションされるといった可能性である。この可能性を検討するため、P8、および P14 ラット由来の脳幹スライスに CaM に対する特異的抗体を用いて蛍光免疫化学染色

を行なった。プレシナプスのマーカーとしてシナプトフィジンをうい、プレシナプスにおける CaM シグナルの平均蛍光強度を算出したところ P8 と P14 では同程度であり、CaM の発現レベルは発達により変化しないと考えられた。

ヘルドの前末端における電位依存性 Ca チャネルのサブタイプは発達に伴い変化することが知られており、発達の初期において発現していた N 型、P/Q 型、R 型 Ca チャネルが、徐々に P/Q 型のみを発現するよう変化する。この Ca チャネルサブタイプのスイッチが CaM 依存的な Ca 電流不活化の消失の要因になっている可能性が考えられた。そこで、P7-8 において N 型 Ca チャネル阻害薬である ω -conotoxin GVIA 存在下で Ca 電流を記録したところ、Ca 電流の不活化が観察された。従って、N 型 Ca チャネルの発達に伴うダウンレギュレーションは Ca 電流不活化のメカニズムではないと考えられた。

次に P7-9 において高濃度の EGTA (10 mM) をパッチ電極を介してプレシナプスに灌流し、Ca 電流を記録したところ、Ca 電流の不活化は完全に消失した。従って、Ca チャネルを介して流入した Ca イオンが CaM と結合し Ca 電流を不活化させると考えられた。では、P14 においてこの不活化機構は完全に消失しているのであろうか？ CaM の発現量が P7 と同程度であることから不活化機構が完全に消失していることは考えづらく、P14 においても Ca イオンが十分に積算すれば不活化が生じる可能性があると思われた。そこで、P14 において Ca 電流を記録し、200Hz の繰り返し刺激を 2s 与えたところ、Ca 電流は促通したのち、徐々に減衰し、不活化した。また、より生理的な刺激として活動電位様のパルス刺激を用いて同様の検討を行ったところ、500Hz の繰り返し刺激により同様の Ca 電流の促通と不活化が観察され、この不活化は CaM 阻害薬である MLCK ペプチドにより抑制された。従って、P14 において CaM 依存的な Ca 電流の不活化機構は存在しているが、何らかの発達変化によって P7 よりも強く刺激され Ca イオンが十分積算した時に初めて観察されるようになっていると考えられた。この発達変化の要因としては発達に伴い CaM 以外の Ca バッファの発現が増加する、Ca ドメインの大きさが変化するなどといった細胞内 Ca 環境の変化がありうると思われる。