

学位論文

カエル神経筋接合部における
シナプス伝達機構

- I. トリニトロベンゼン誘導体の伝達物質放出増大効果
- II. シナプス前神経末端内の Ca^{2+} イメージング

1995年

名古屋大学大学院理学研究科物理学専攻

小山内 実

①

学位論文

カエル神経筋接合部における
シナプス伝達機構

- I. トリニトロベンゼン誘導体の伝達物質放出増大効果
- II. シナプス前神経末端内の Ca^{2+} イメージング

1995年

名古屋大学大学院理学研究科物理学専攻

小山内 実

要旨

シナプスでの神経伝達物質放出機構やシナプス伝達の可塑性を調べる事は、脳などの中枢神経系での高次の情報処理を知るうえで非常に重要である。また、神経伝達物質の放出及び、シナプス伝達の短期可塑性には細胞内カルシウムイオンが重要な役割をしている。

そこで、今回の研究ではカエル神経筋接合部のシナプスを用いて、神経伝達物質の放出機構及びシナプス伝達の可塑性の機構を調べるために、第一に神経刺激による伝達物質の放出を特異的に増加させるトリニトロベンゼン誘導体のシナプス伝達に対する影響を調べ、第二に、伝達物質の放出機構とその短期可塑性に直接関係しているシナプス前末端内のカルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) をカルシウム蛍光指示薬を用いて測定した。その結果は次の通りであった。

(1)

神経伝達物質の放出を増大させることが報告されているアミノ基修飾試薬 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid (TNBS) からスルホン酸基を取り除きアミノ基修飾作用をなくした試薬 1-(hydroxyethylamino)-2,4,6-trinitrobenzene (HEATNB) を合成し、神経筋接合部シナプスに投与した。この試薬も刺激時の神経伝達物質の放出を著しく増大させ、その効果は TNBS とは違い投与中持続し、完全に可逆的であった。このことから、神経伝達物質の放出の増加は、TNBS のアミノ基修飾作用によるものではなく、トリニトロベンゼン残基が神経伝達物質放出機構に影響を与えている事によるものだという結果が得られた。

また HEATNB は、細胞外液に 0.15 mM 投与したとき、神経刺激による神経伝達物質の放出を約 4 倍に増加させたが、自発的な神経伝達物質の放出の頻

度を2倍以下にしか増加させなかった。このことは、刺激による伝達物質放出機構と自発的な放出機構とが異なっている事を示唆し、HEATNBはそのうち、刺激による放出機構に特異的に影響を与えていると考えられる。

次に、HEATNBを作用させた状態で、連続刺激によるシナプス伝達の可塑性について調べた。その結果、シナプス伝達の4種の短期可塑性のうち増進を著しく減少させ対照の約30%になった。また、増強を対照の約150%に増加させた。このことは、HEATNBがシナプス伝達の短期可塑性のうち増進を引き起こす機構に直接影響を与えていると考えられる。さらに、シナプス前末端内に、カルシウムキレート剤であるBAPTAを負荷しても、神経伝達物質放出に対するHEATNBの効果は負荷前と同じであった。以上の事から、HEATNBは刺激時の神経伝達物質の放出に特異的に影響を与え、シナプス伝達の短期可塑性のうち増進を著しく減少させ、さらにこれらの効果は、細胞内カルシウム濃度を変化させたために起ったのではないという結果が得られた。

この試薬はシナプスの伝達機構を知る上で非常に有用であるということが言えよう。

(2)

神経伝達物質の放出及びシナプス伝達の短期可塑性に非常に重要な役割をしているシナプス前神経末端内の $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った。

今まで、カエルの神経筋接合部のシナプスではカルシウム蛍光指示薬の負荷が困難であるなどの理由から、 $[Ca^{2+}]_i$ の定量的な測定は行われていなかった。今回私は、軸索輸送の手法を用いることにより、カエルの神経筋接合部シナプス前末端に初めてカルシウム蛍光指示薬Indo-1を負荷することに成功し、 $[Ca^{2+}]_i$ の定量的な測定を行うことができた。

様々な条件で、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ は神経刺激後に数百ミリ秒の減衰時定数で減衰してしまうことが判明した。また、同じ回数刺激でも刺激間隔が長くなればなるほど、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は小さくなり、条件によっては刺激中にも関わらず $[Ca^{2+}]_i$ が減少する例が見られた。これらの結果は、細胞内の Ca^{2+} 処理(調節)機構が非常に速く動作し、細胞内の Ca^{2+} を細胞外へ排出したり、細胞内オルガネラへ取り込んだりしていることを示唆している。

カエルの神経筋接合部シナプスにおけるシナプス伝達の短期可塑性にはその時定数により4つの成分があることが知られている。短期可塑性の4つの成分のうち増進の時定数は数秒、増強の時定数は数十秒から数分であるが、今回の結果では、刺激の長さに関わらず $[Ca^{2+}]_i$ の減衰の時定数は数百ミリ秒であった。したがって、短期可塑性のうち増進と増強は、刺激後細胞内に残っている残存カルシウムでは説明が困難であることが解った。

この結果は、シナプス伝達の短期可塑性への $[Ca^{2+}]_i$ の関与、及び $[Ca^{2+}]_i$ の調節機構について重要な知見を得るものである。

目次

要旨	i
目次	iv
§I 序論	
I-1 神経系の基本単位及び高次機能	1
I-2 ニューロンとシナプスの構造と機能	2
I-3 シナプス前末端からの神経伝達物質放出機構	4
I-4 シナプスにおける伝達の可塑性と高次機能	6
I-5 細胞内 Ca^{2+} の神経伝達物質放出への関与	9
I-6 細胞内 Ca^{2+} のダイナミクスとシナプス伝達の可塑性への関与	10
I-7 モデルシナプスとしてのカエル神経筋接合部シナプス	13
I-8 今回の研究の目的	19
§II カエル神経筋接合部におけるシナプス伝達機構へのトリニトロベンゼン誘導体の伝達物質放出増大効果	
II-1 序	21
II-2 実験方法	24

II-2-1	電気生理の手法	24
II-2-2	1-(hydroxyethylamino)-2,4,6-trinitrobenzene(HEATNB)の合成	25
II-2-3	神経末端への BAPTA の負荷	26
II-2-4	データ解析	27
II-2-5	試薬	31
II-3	結果	32
II-3-1	HEATNB が EPP 振幅及び MEPP 頻度に与える効果	32
II-3-2	細胞外カルシウム濃度を下げた条件での HEATNB の効果	36
II-3-3	HEATNB が増進及び増強に与える効果	37
II-3-4	BAPTA で $[Ca^{2+}]_i$ をバッファーした際の HEATNB の効果	41
II-4	議論	46
II-4-1	TNBS と HEATNB の作用様式: 類似点と相違点	46
II-4-2	HEATNB が作用する場所	48
II-4-3	HEATNB がシナプスの短期可塑性の 4 つの成分に与える効果	50
§III	カエル神経筋接合部におけるシナプス前神経末端内での Ca^{2+} イメージング	
III-1	序	51
III-2	実験方法	56
III-2-1	Indo-1 の軸索輸送によるシナプス前末端への負荷	56
III-2-2	電気生理学的手法	56
III-2-3	蛍光測定装置と蛍光測定の手法	57

III-2-4 得られた蛍光強度から Ca^{2+} 濃度を求める方法	59
III-2-5 試薬	60
III-3結果	61
III-3-1 Indo-1 によって染色したカエル神経筋接合部のシナプス前末端	61
III-3-2 50Hz 500 回の刺激を行った時のシナプス前末端全体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化	61
III-3-3 様々な神経刺激パターンと様々な $[\text{Ca}^{2+}]_e$ での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化	67
III-4議論	79
III-4-1 Indo-1 の軸索輸送の機構	79
III-4-2 シナプス前末端内での Ca^{2+} ダイナミクス	80
III-4-3 シナプス伝達の短期可塑性への Ca^{2+} の寄与	82
謝辞	84
参考文献	85

§ I 序論 (cf. クフラーら 1988, pp. 3-9; 葛西ら 1988; 辻 1995)

I-1. 神経系の基本単位及び高次機能

生物の神経系は、脳などの中枢を中心に、感覚神経や運動神経などが、身体の間々まで行き渡っている。その神経系において重要な役割をしているのは、脳などの中枢神経系である。その脳の中には非常にたくさんの神経細胞(ニューロン)が存在し、情報処理の基本単位となっている。また、これらニューロン間の信号を伝達している部分をシナプスと呼ぶ。このニューロンが絶え間なく活動を続けシナプスを介して情報を伝達する事により、生物は、見たり、聞いたり、感じたり、考えたり、行動したりする事が可能なのである。

神経系での情報処理は神経インパルスというパルス状の電気信号が伝達の基本単位となっていて、この信号はどのニューロンでも(全ての動物において)共通なものであり、そのインパルスを見ただけではその信号がどんな情報を伝えているのかは判別することができない。しかし、これが様々なニューロン間で処理されることにより、より高度の情報処理が行われ、意識・知覚・認識などの高次機能の発現のもととなっていくのである。

では、個々のニューロンをとってみればどれも同じ様な機能しか持っていないのに、高次機能を発現するような情報処理はどこが担うのであろうか。

その答は、コンピュータのような情報処理系を考えてみれば想像がつく。コンピュータは同じような素子をいくつもつなぎ合わせて情報処理をしているが、個々の役割は異なっている。この特殊性は配線の違いからきているも

のであり、回路の多様性を増せば機能も複雑にできる。つまり、脳内のニューロンはその機能毎に特有の回路を持っており、それぞれが関係しあう事によって様々な高次機能を生み出しているものと考えられる。

1-2. ニューロンとシナプスの構造と機能

ニューロンとシナプスの模式図を図 I-1 に示す。神経系の情報伝達の基本単位はインパルスであることは先に述べたが、その具体的な伝達機構についてここで述べる。

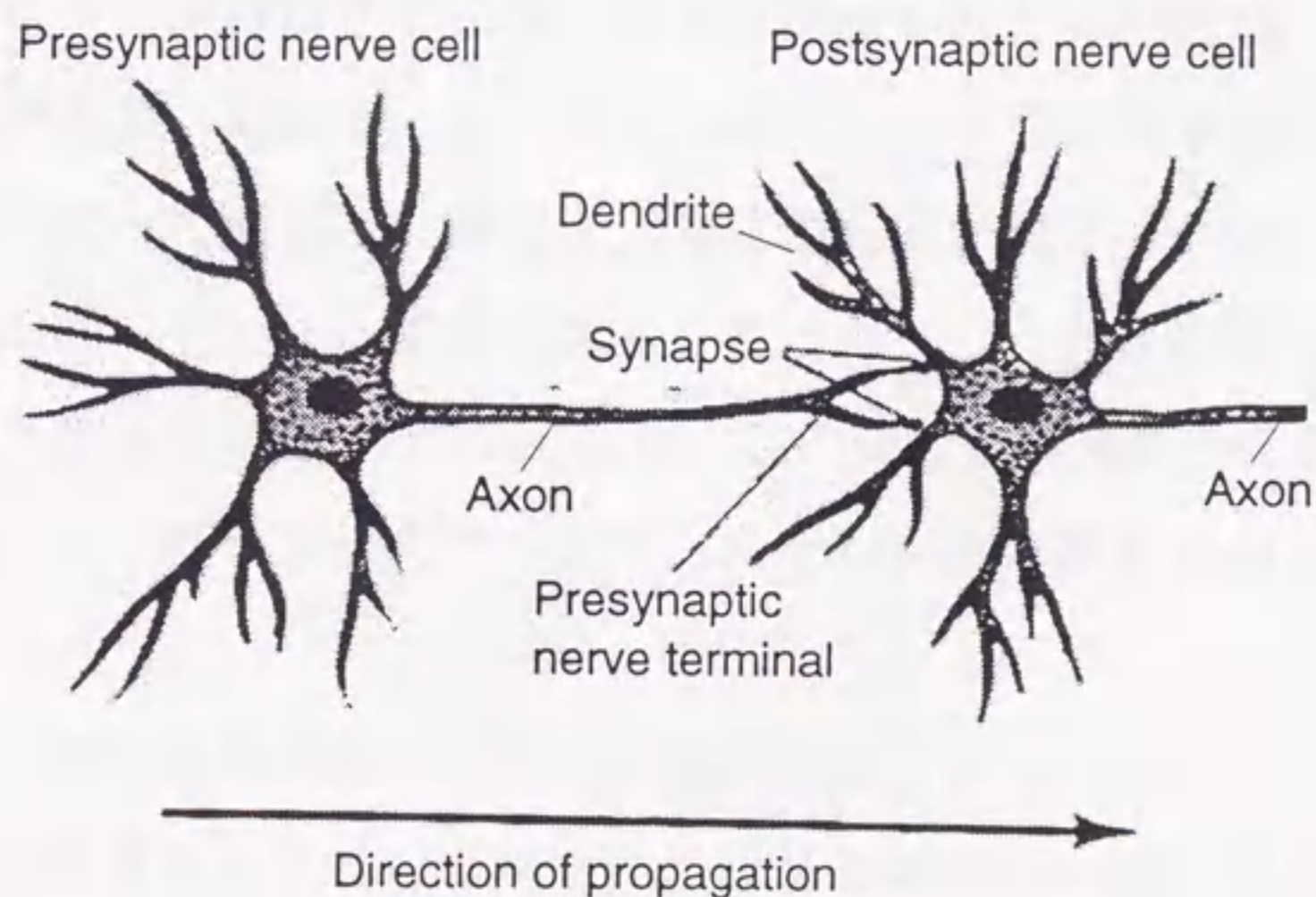


図 I-1 ニューロンとシナプスの模式図。シナプス前神経細胞(Presynaptic nerve cell)で発生したインパルスは、神経軸索(Axon)を伝わり、シナプス前神経末端(Presynaptic nerve terminal)からシナプス(synapse)を介して樹状突起(Dendrite)からシナプス後細胞(Postsynaptic nerve cell)へと伝達される(Nicholls et al. 1992, pp. 26)。

シナプス前細胞で発生したインパルスは、神経軸索を伝わり、シナプス前神経末端に到達する。シナプス前神経末端では、到達した電気信号を化学信号(神経伝達物質)に変換してシナプス後細胞に情報を伝達する。この時、シナプス後細胞では、樹状突起上にある受容体に受容された神経伝達物質の量に従って、脱分極性の電位変化(一般に細胞内は細胞外に比べてマイナスの電位を持っているので、この場合はプラス側への電位変化)が起きる。しかし、この電位変化がある閾値を越えないと、次の細胞に伝達する前に減衰してしまう(このような電位変化を局所電位と呼ぶ)。しかし、この局所電位がいくつも重ねあわされて、その電位変化が閾値を越えると、活動電位(インパルスそのもの)が発生し、軸索を伝わり信号がまた次の細胞へと伝播して行く。このようなインパルスの発生を促す信号を伝達するシナプスを興奮性のシナプスと呼ぶ。

興奮性のシナプスとは逆にインパルスの発生を抑える抑制性のシナプスを介した伝達がある。抑制性のシナプスの場合、シナプス前末端では、インパルスの到着に従って抑制性の神経伝達物質の放出が起り、それが、シナプス後細胞の抑制性の受容体に受容されることによって、過分極性の(細胞外に比べてマイナス側への)電位変化が起こる。この変化が興奮性入力による脱分極性の電位変化と打ち消しあうことで、インパルスの発生を抑えることができる。

実際に、中枢神経系を用いた最近の実験やコンピューターシミュレーションによる研究により、これらの興奮性の信号と抑制性の信号の入力するタイミングや場所の違いによってかなり複雑な情報処理が行えることが示されている(cf. IBRO 1995, S17: Integrative Processes in Dendrites)。これは、ニューロンの統合(Integration)機能と呼ばれている。

1-3. シナプス前末端からの神経伝達物質放出機構

ニューロンとニューロンの接合部であるシナプスには化学シナプスと、電気シナプスの2種類がある。電気シナプスは文字通り、神経インパルスをそのまま電氣的に伝えるシナプスのことであるが、ここではその詳細については取り上げない。

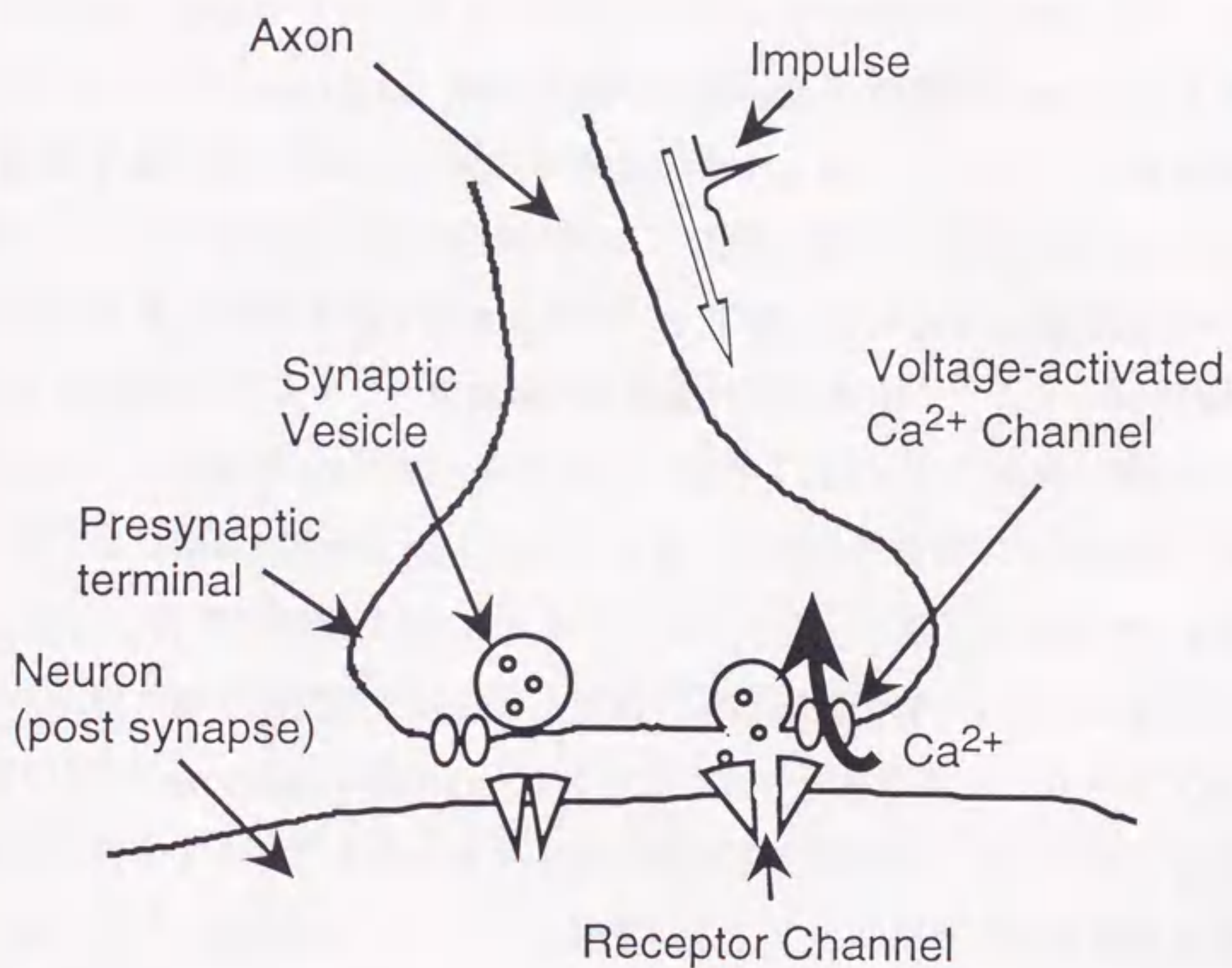


図 1-2 シナプス伝達の模式図。シナプス前末端に神経軸索(Axon)を通じて到達したインパルスにより電位依存性のカルシウムチャネル(Voltage-activated Ca^{2+} Channel)が開き細胞内にカルシウム(Ca^{2+})が流入する。その結果、シナプス小胞(Synaptic Vesicle)の開口放出を引き起こし神経伝達物質が放出される。その伝達物質はシナプス後側の受容体複合型チャネル(Receptor Channel)に受容されシナプス後細胞(Neuron)に情報が伝達される。

化学シナプス(以下単にシナプス)においては、前述のようにシナプス前末端から神経伝達物質が放出され、シナプス後側の受容体によって神経伝達物質が受容される事により、シナプス後側のニューロンに信号が伝えられる。シナプス前末端からの神経伝達物質の放出機構の詳細は、今なお解明されていない部分が多く残されているが、大まかなストーリーは神経伝達物質の種類によらずおおよそ以下に述べるようになっている。

神経伝達物質はシナプス前末端内のシナプス小胞という直径が数十ナノメートルから数百ナノメートルの小胞にほぼ一定の濃度で貯蔵されている。いくつかのシナプス小胞は、神経伝達物質放出部位(活性帯(active zone); 図 I-6 参照)で細胞膜と結合し、放出の準備段階にある。このシナプス前末端部位にインパルスが到達すると活性帯のごく近傍に存在する電位依存性のカルシウムチャネル(細胞が脱分極する事によって開くカルシウム透過性のイオンチャネル)を通してシナプス前末端内に細胞外からカルシウムイオン (Ca^{2+}) が流入し、その結果 Ca^{2+} 流入部位のごく近傍では Ca^{2+} の濃度が局所的に非常に高くなる(Heidelberger et al. (1994) によると金魚の網膜の双極細胞では約 $200 \mu\text{M}$)。この局所的高濃度 Ca^{2+} がトリガーとなって放出準備段階にあるシナプス小胞の膜が細胞膜と融合し小胞内の神経伝達物質が細胞外に放出される(開口放出; exocytosis) (図 I-2)。この放出された伝達物質が、シナプス後の受容体と結合する事によりチャネルの開閉状態を過渡的に変化させ、前述のようにシナプス後側のニューロンに興奮性もしくは抑制性の局所電位変化をもたらす。また、シナプス前末端では、インパルスが到達しなくても自発的な神経伝達物質の放出が起る。この自発的な放出はシナプス小胞1個が開口放出することによって起る。シナプス小胞に含有されている神経伝達物質の量はほとんど一定なので、自発的な放出によって起る局所電位の振幅はシナプス後側の性質が変わらない限りほぼ一定に保たれる。従って、後述するよ

うに、自発的な放出による局所電位の振幅を調べることにより、シナプス後側の性質の変化の有無を知ることができる

現在のところ、これら開口放出に関する具体的な機構については未だ多くのことが解らないままである。インパルスに伴って起きる開口放出と、自発的な開口放出とが全く同じ機構で起こっているのかさえ未解明のままである。

1-4. シナプスにおける伝達の可塑性と高次機能

個々のニューロンでの情報処理は先に述べた通りであるが、このような過程だけでは、記憶などのより高次の機能については、説明することができない。そこで、ニューロンとニューロンの接合部であるシナプスが重要な役割を担ってくる事になる。

これまでの様々な研究により、シナプスは、活性依存性の伝達効率の変化をする事が知られており、それはシナプス伝達の可塑性と呼ばれる。つまりあるシナプスに高頻度(あるいは低頻度)の連続したインパルスが到達することにより、シナプス前側からの神経伝達物質の放出確率、もしくは、シナプス後側の神経伝達物質に対する感受性、あるいは、その両方が変化しそのシナプスにおける伝達効率の変化が起る。このシナプス伝達の可塑性は、記憶・認知・学習に代表されるような脳内の高次機能の基になっていると考えられており、前述の統合機能と合わせて、脳内における情報処理の大部分はシナプスが担っているといっても過言ではない。

シナプス伝達の可塑性には長期の可塑性と短期の可塑性が存在する。長期の可塑性には長期増強(Long Term Potentiation, LTP)、長期抑圧(Long Term

Depression, LTD)がある。これらは、どちらも、数時間から数日に及ぶものであり、記憶などの基となっていると言われている。これらの長期可塑性にはシナプス前由来(放出確率の変化)のものとシナプス後由来(伝達物質に対する感受性の変化)のものがあることが知られている。シナプス後由来のものは様々な研究がなされており、近年その機構については急速にいろいろなことが解ってきた。しかし、シナプス前由来のものについては、その機構はほとんど解明されていない。短期可塑性には、中枢では paired-pulse facilitation, post-tetanic potentiation など、神経筋接合部シナプスにおいては、促通 (facilitation)、増進(augmentation)、増強(potentiation)などの、数十ミリ秒から数分に渡る神経伝達物質の放出増大の効果が知られている。しかし、これらの現象はシナプス前由来であることは解っているが、その機構についてはほとんど解明されていない。また、短期可塑性と長期可塑性の関係についても良く解っていない。

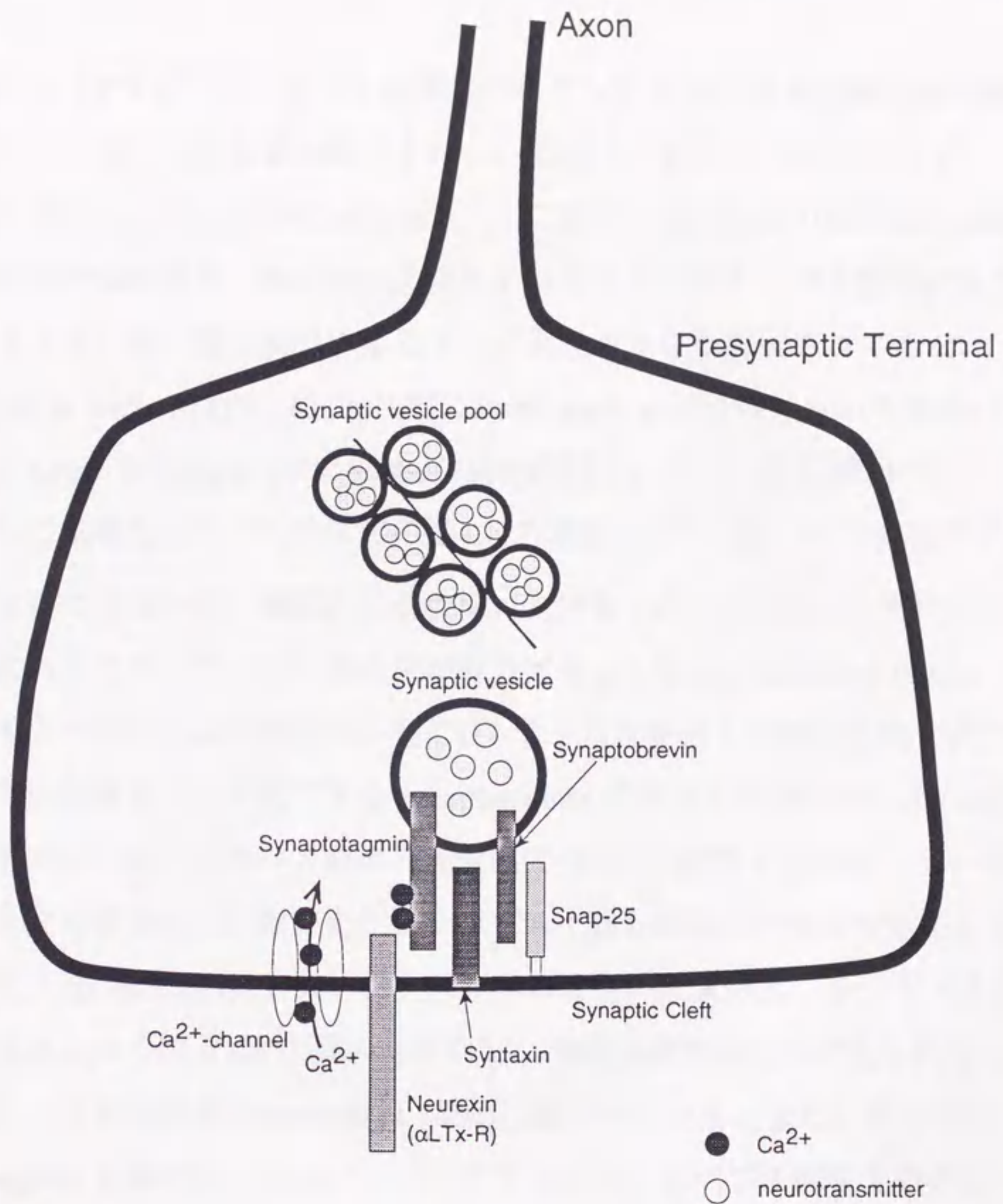


図 I-3 シナプス前末端からの神経伝達物質放出に関与している代表的なタンパク質とシナプス小胞 (Synaptic vesicle)、神経伝達物質(neurotransmitter)及び細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})の関係。シナプス小胞には活性帯のシナプス前膜と結合した放出準備段階にあるものと細胞内の「プール」(Synaptic vesicle pool)に貯蔵されているものがある。「プール」にある小胞は細胞骨格と結合していると考えられている。図に示したタンパク質や小胞やイオンなどの大きさは実際の大きさの関係とは無関係である。

I-5. 細胞内 Ca^{2+} の神経伝達物質放出への関与

前述のように Ca^{2+} がシナプス前末端内に流入する事が神経伝達物質の開口放出のトリガーとなる事は確立されている(図 I-2 参照)。これは「 Ca^{2+} 説」と呼ばれる(*cf.* Katz & Miledi 1967)。ここ数年、開口放出の具体的な機構についての研究が進み、開口放出に関与するたくさんのタンパク質が同定され、シナプス小胞の開口放出に至るまでの過程がかなり解明されてきた (McMahon & Nicholls 1991; Kelly 1993; Zimmermann et al. 1993; Jahn & Südhof 1994; Burgoyne & Morgan 1995; Südhof 1995)(図 I-3)。また、開口放出のトリガーとして重要なシナプス前末端内の Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)もいくつかの系では測定されてきている。開口放出の機構における Ca^{2+} の関与の仕方については現在のところ以下のような仮説が有力である(Littleton & Bellen 1995)。

神経インパルスにより電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通して流入した Ca^{2+} はシナプス小胞膜タンパク質である synaptotagmin に結合する(図 I-3)。その結果、シナプス小胞とシナプス前側の細胞膜(シナプス前膜)とを結合しているタンパク質の複合体の配置が変化しシナプス小胞と細胞膜の融合が起る。この仮説は、synaptotagmin を欠いた突然変異体を用いた実験で、シナプス前神経の刺激によって起る Ca^{2+} 流入と同期した神経伝達物質放出が見られなくなったという実験結果(Geppart et al. 1994)に基づいている。また、彼らは synaptotagmin が存在していないと、シナプス小胞とシナプス前膜を結合している複合体が不完全なものとなるため、自発的な神経伝達物質の放出の頻度は上昇するという結果も出している(Geppart et al. 1994)。

シナプス小胞は、シナプス前膜と結合する前の段階では細胞内の「プール」に貯蔵されていて、必要に応じて輸送されて、放出部位(活性帯)のシナプス前膜に密着した(docking)状態になる。と考えられている。また、開口放

出を起こした後、小胞膜は細胞膜から回収される(endocytosis)。これらの膜の輸送系全般にも細胞内の Ca^{2+} が深く関わっていると考えられている (Burgoyne & Morgan 1995)。

I-6. 細胞内 Ca^{2+} のダイナミクスとシナプス伝達の可塑性への関与

前述のようにシナプス前末端からの神経伝達物質放出の活性依存の変化(シナプス前由来のシナプス伝達の可塑性)の機構についてはほとんど解明されていない。しかし、ある種の可塑性については細胞内の Ca^{2+} が重要な役割をしている(後述)と考えられている。

細胞には一般的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を低く一定に保とうとする仕組みが備わっている(細胞外の Ca^{2+} が数 mM なのに対して細胞内は 100 nM 程度に通常は保たれている)。細胞の興奮などにより一旦増加した細胞内 Ca^{2+} は、細胞外への排出や、小胞体のような細胞内オルガネラに取り込まれる事によって制御され静止状態の Ca^{2+} 濃度レベルに戻る。具体的には、以下のような Ca^{2+} 排出機構がある(図 I-4)(Pietrobon et al. 1990; McMahon & Nicholls 1991; Werth & Thayer 1994)。Na-Ca exchanger は Na^+ と Ca^{2+} を一方のイオンの電気化学的な自由エネルギー勾配を用いて他方を逆方向に輸送する。 Ca^{2+} -ATPase は ATP のエネルギーを用い、能動的に Ca^{2+} を細胞内オルガネラに取り込んだり細胞外に排出する。ミトコンドリアは細胞内 Ca^{2+} 濃度が異常に高くなった場合に Ca^{2+} を取り込んで細胞を守る。また、細胞内の Ca^{2+} 結合タンパク質も細胞内の Ca^{2+} の調節に関与している。

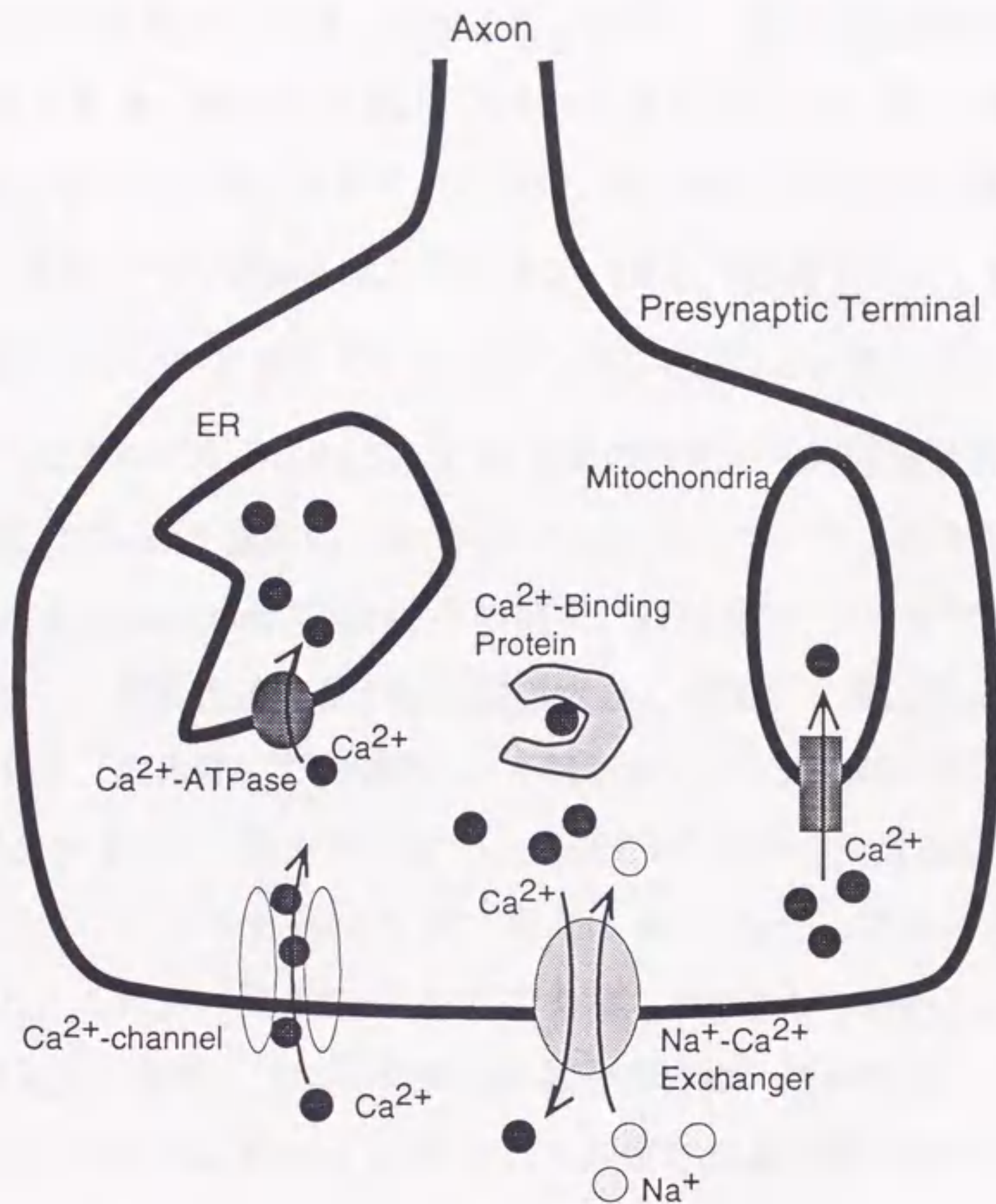


図 1-4 細胞内 Ca^{2+} の調節機構の代表的なものの模式図。細胞外より流入した Ca^{2+} は様々な機構を通して処理される。ER は小胞体の事である。

神経細胞の場合、インパルスの到達に伴って流入した Ca^{2+} がシナプス前由来のシナプス伝達の可塑性にどのように関わっているかは多く不明の点が残されているが、残存 Ca^{2+} 仮説は、ある種のシナプス伝達の可塑性への細胞内 Ca^{2+} の関与を説明できる。前述のように、インパルスの到達により細胞内に流入した Ca^{2+} は放出部位に局所的な高濃度 Ca^{2+} 領域を作る(これが放

出のトリガーとなることは前述の通りである)。Ca²⁺の流入停止後、この高濃度Ca²⁺は末端内に拡散してゆくのと同時に、様々な経路を通じて細胞外へ排出されたり、細胞内のCa²⁺ストアに取り込まれたりして静止状態のCa²⁺濃度レベルに戻ってゆく。この時、放出部位でのCa²⁺濃度が静止状態のCa²⁺濃度レベルに戻る前に次のインパルスが到達すると、放出部位でのCa²⁺濃度はその時に残っているCa²⁺(残存Ca²⁺)と、流入によるCa²⁺とが加算されたものになる(図 I-5)。これまでの研究から神経伝達物質の放出量は放出部位でのCa²⁺濃度の n 乗($n \sim 4-5$)に比例していると推定されているので(Dodge & Rahamimoff 1967)、その結果、放出部位でのCa²⁺濃度が少しでも増えると、神経伝達物質の放出量は大きく増加する事になる。例えば $n=4$ としたとき、放出部位での残存Ca²⁺濃度がCa²⁺流入時の放出部位でのCa²⁺濃度の $1/10$ であるとする、残存Ca²⁺のみでは放出はほとんど起こらないが(インパルス到達時の 10^{-4} 程度)、流入Ca²⁺に加わると約1.5倍の放出が起る。これが、残存Ca²⁺仮説である。中枢では paired-pulse facilitation (Wu & Saggau 1994)、カエルの神経筋接合部では、速い促通(fast facilitation)(Tanabe & Kijima 1992)として観察される現象の説明として有力である。

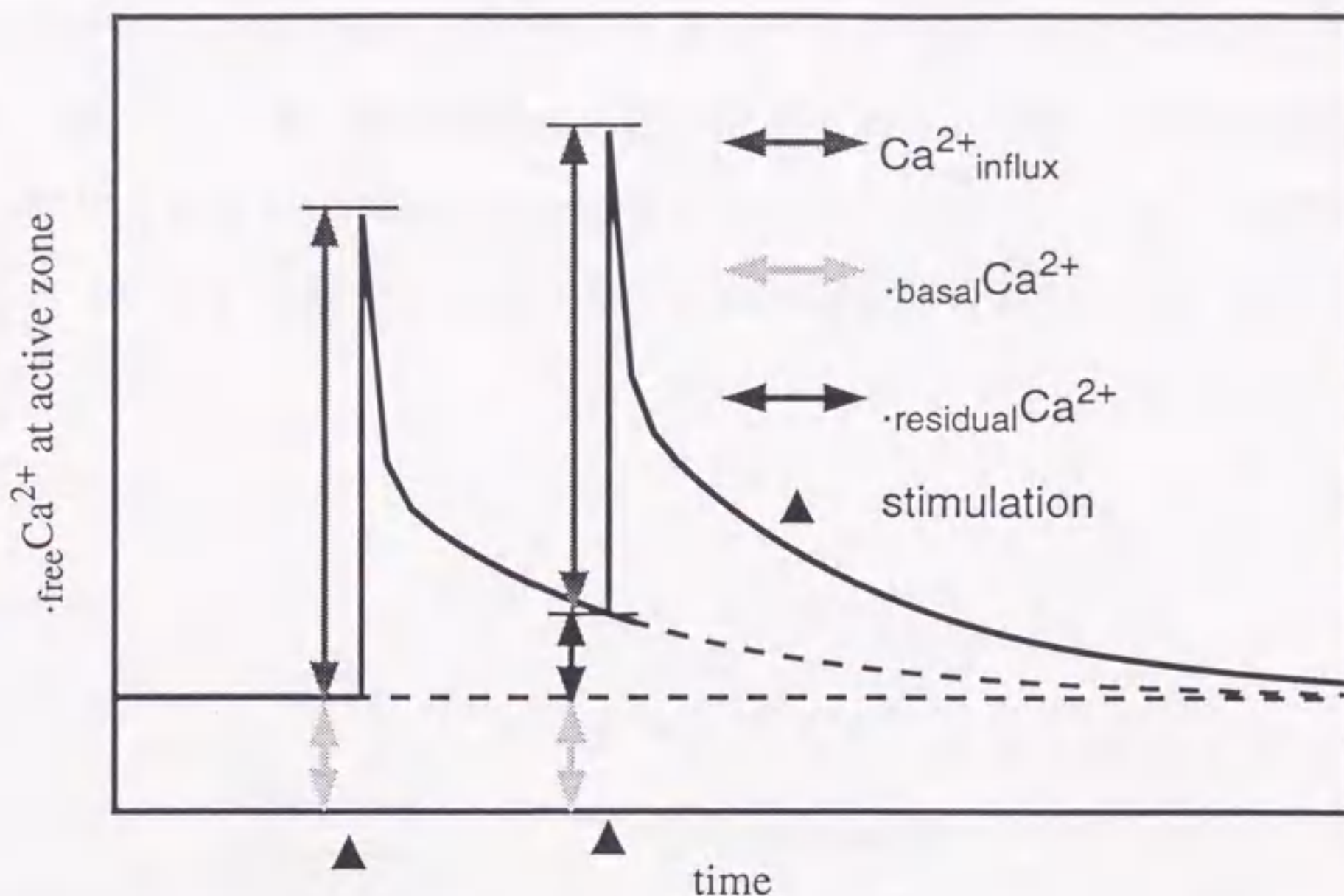


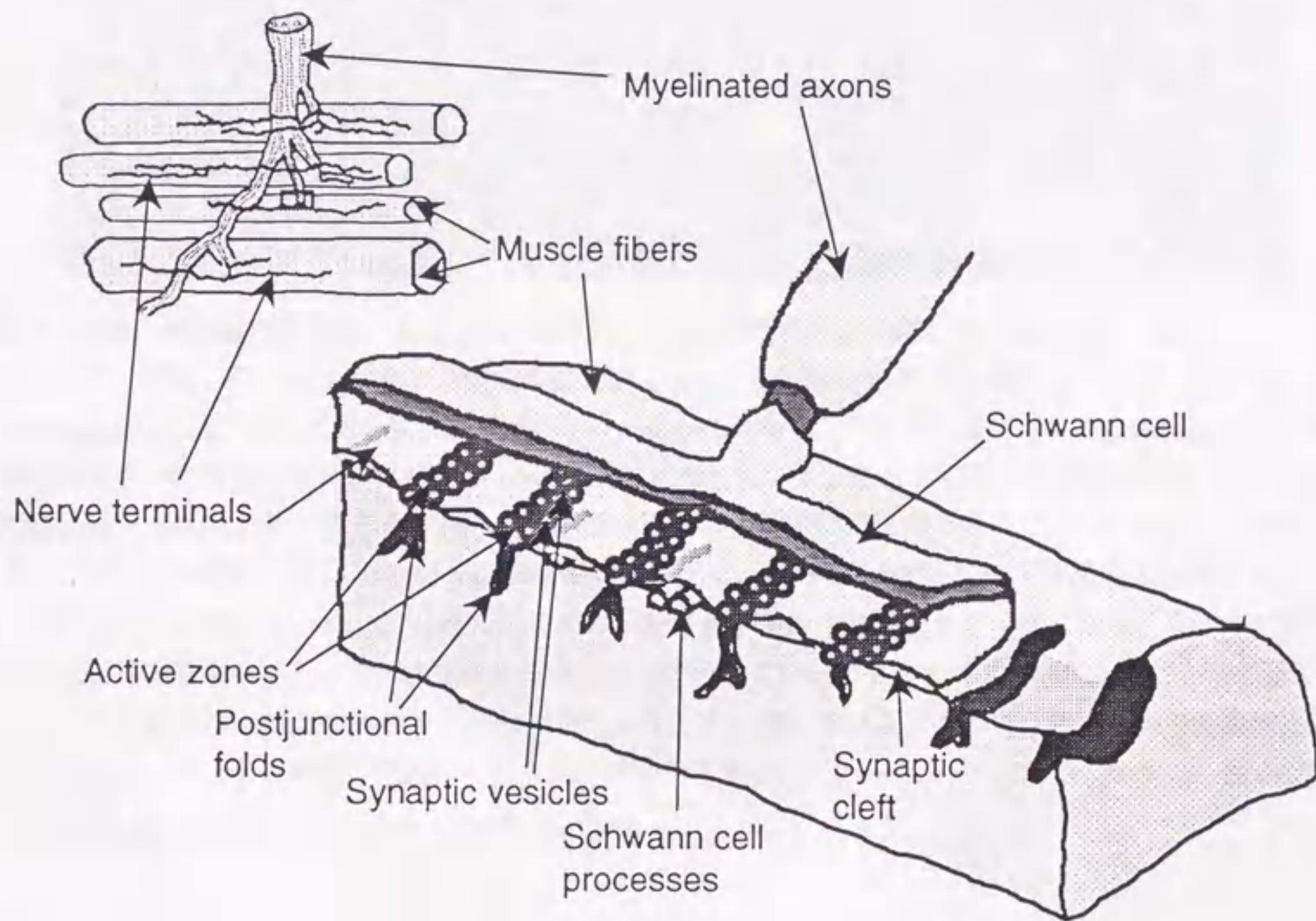
図 I-5 残存 Ca^{2+} 仮説。縦軸は神経伝達物質放出部位での遊離 Ca^{2+} の濃度、横軸は時間を示す。神経刺激によりシナプス前末端の放出部位に Ca^{2+} が流入する ($\text{Ca}^{2+}_{\text{influx}}$)。刺激後 Ca^{2+} 濃度は徐々に減衰していくが(黒の実線)、 Ca^{2+} 濃度が静止時の Ca^{2+} 濃度 (basal Ca^{2+}) に下がる前に次の刺激が到達すると、その時の Ca^{2+} 濃度は刺激によって流入した Ca^{2+} と、その時点で残存していた Ca^{2+} (residual Ca^{2+}) の和になる。

I-7. モデルシナプスとしてのカエルの神経筋接合部シナプス

ここまで、神経系での情報処理におけるシナプス伝達の重要性を述べてきたが、シナプス伝達の素過程を研究するうえで、中枢神経系の神経細胞を用いる事はその複雑さなどの理由から困難を伴う。そこで、シナプス伝達の機構を直接解明するために単純なモデル系が望まれる。神経筋接合部のシナプス(シナプス前末端が運動神経末端で、シナプス後細胞が筋肉であるシナプ

ス)は、単入力、単出力であり、しかも、シナプス前側の細胞体がなくても運動神経軸索から神経終末までを使って実験できるため、細胞体の特徴を排除した、シナプスだけの特性を調べる事が可能である。これらの理由から、カエルやザリガニなどの神経筋接合部をモデルシナプスとした多くの研究が行われてきている。本研究では私はカエルの神経筋接合部シナプスを標本として用いた。

A



B

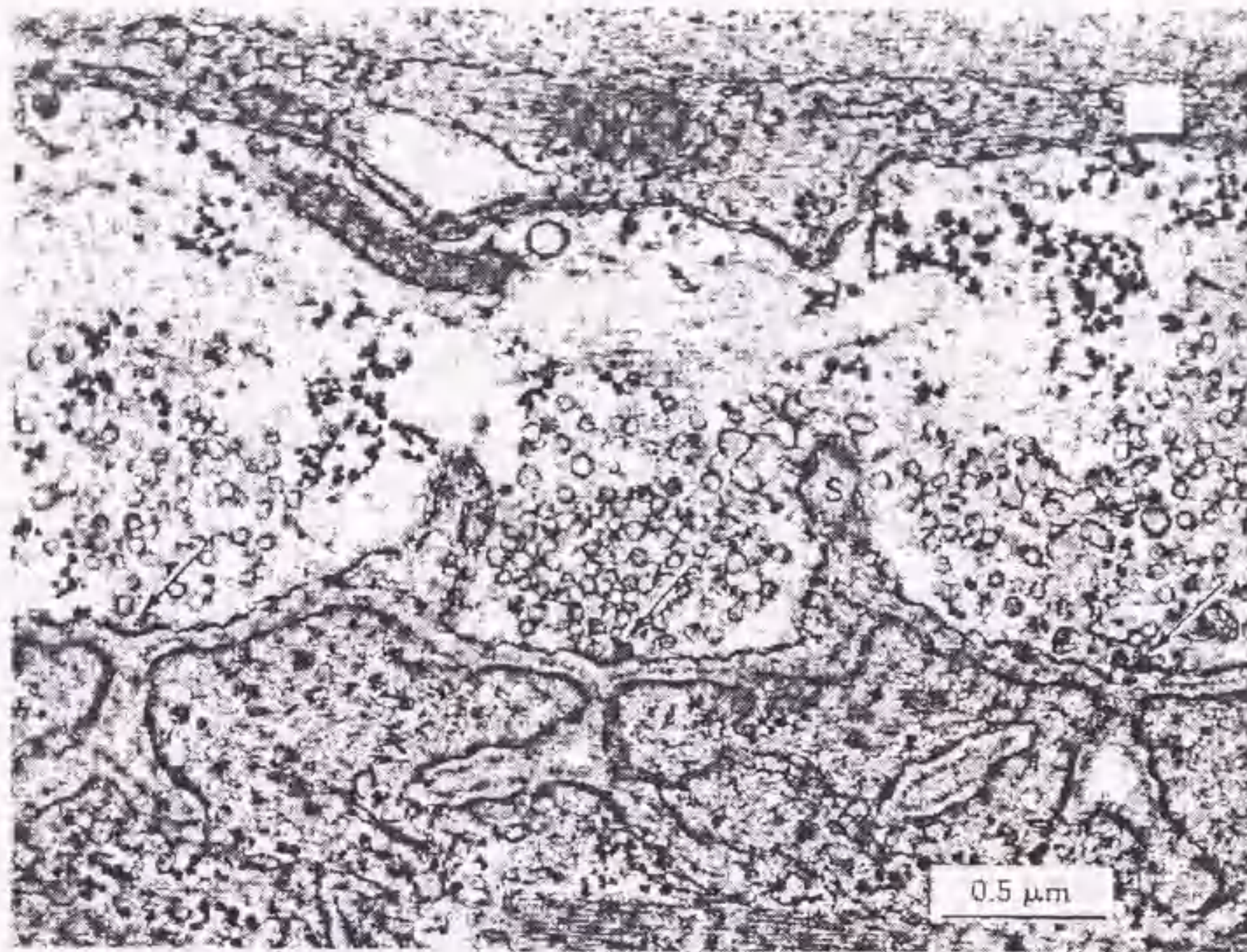
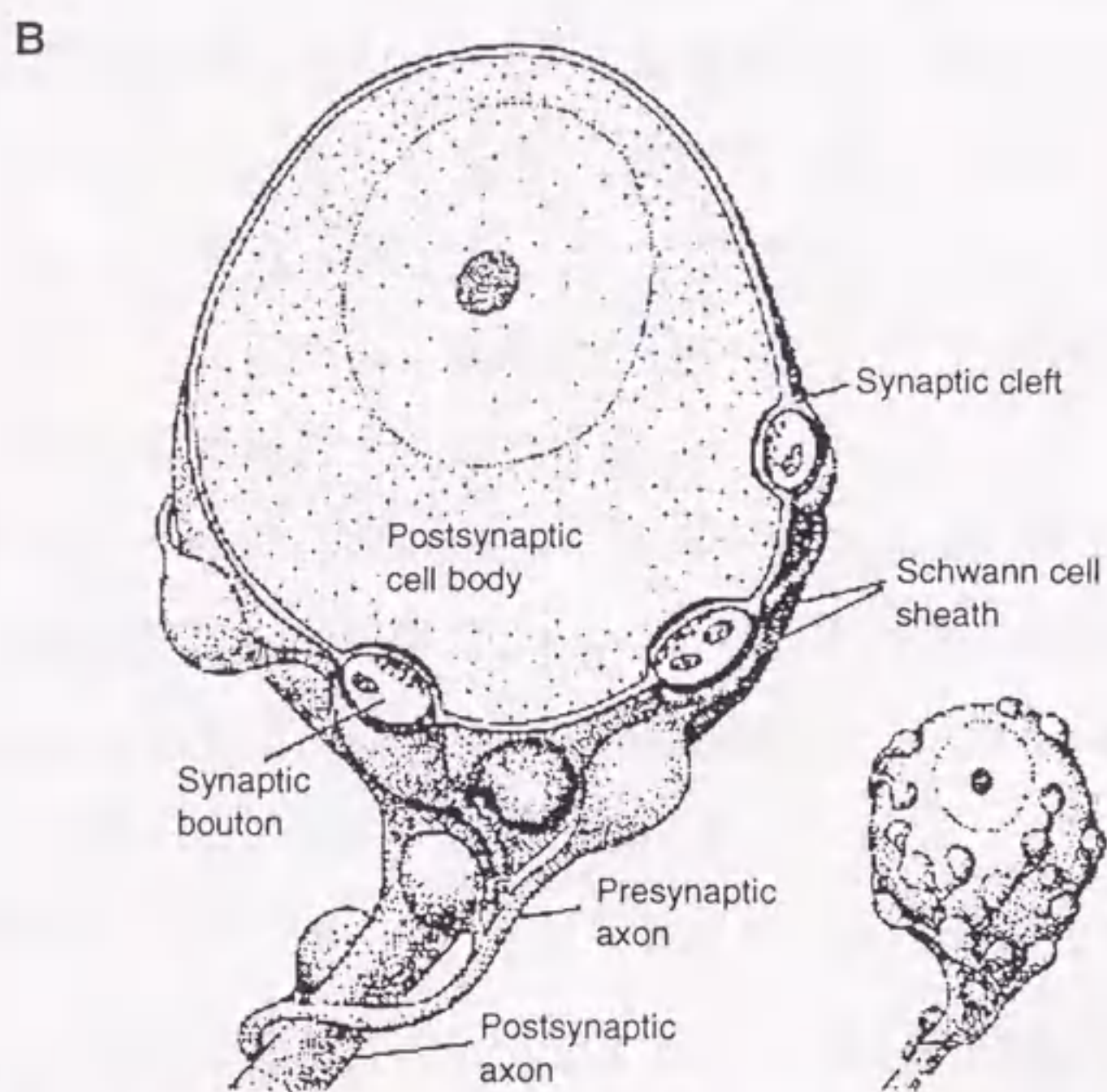
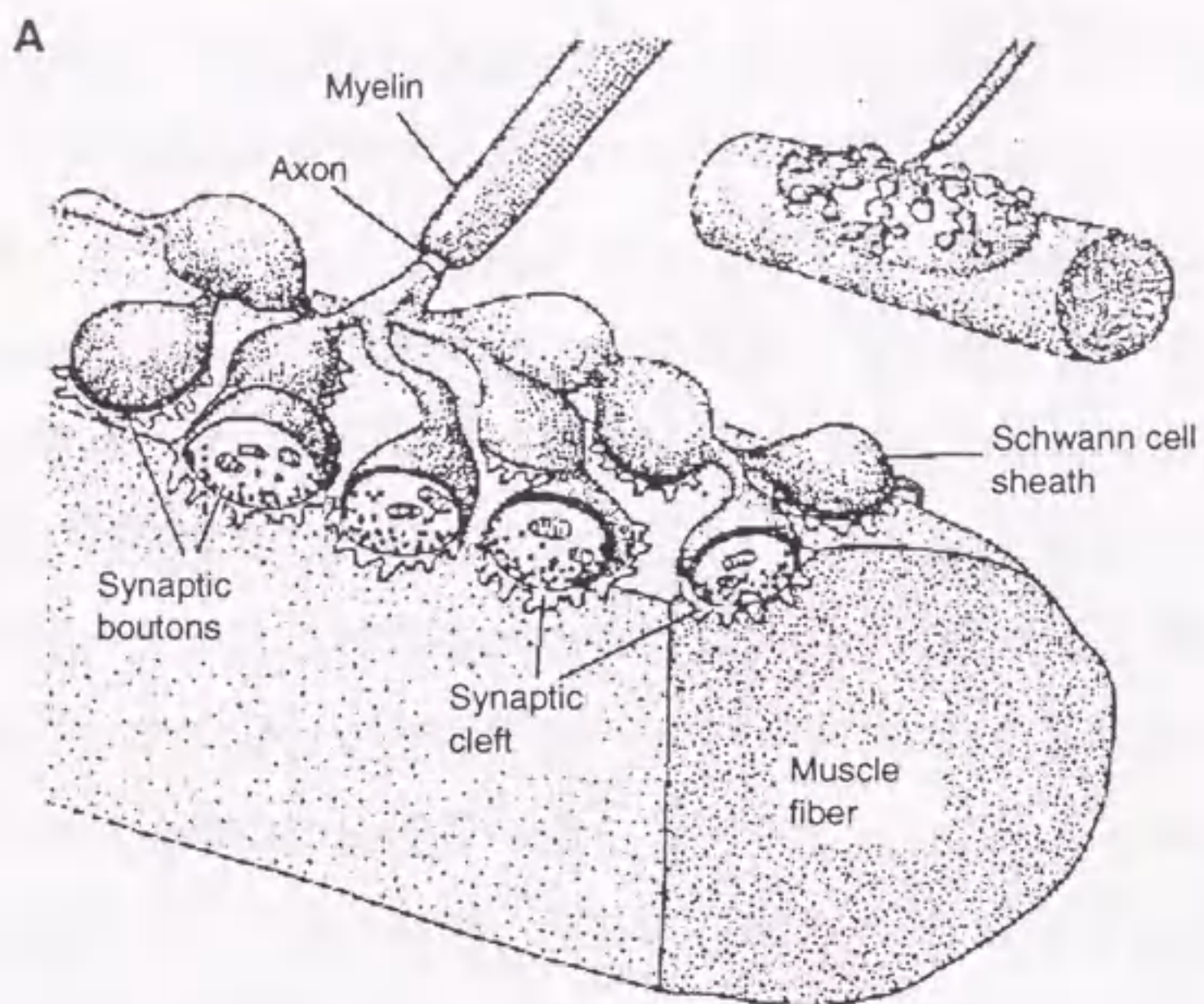


図 1-6 カエルの神経筋接合部。A. 左上の図にはカエルの骨格筋の筋繊維とその神経支配の様子が示してある。その下の図は、シナプス結合した領域の拡大図である。神経終末部以外の軸索はミエリン鞘を被っている(Myelinated axon)。シナプス小胞は神経終末(Nerve terminal)内で、シナプス後ひだ(Postjunctional folds)の開口部に向き合った特別な領域、活性帯(Active zone)に密集している。これらの活性帯は伝達物質をシナプス間隙(Synaptic cleft)に放出する部位であり、この活性帯のごく近傍に電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが分布している。シュワン細胞の突起 (Schwann cell process; B 図中の S) は、神経終末とシナプス後膜との間を走っており、活性帯を切り離している。B. 運動神経終末の一部の電子顕微鏡写真。スケッチに示した多くの形態が見られる。神経終末中でシナプス小胞がクラスターを形成していることが分かる(矢印)。ここが活性帯である。シュワン細胞の突起(S)はシナプス小胞のクラスターを分離している。このようにカエルの神経筋接合部の神経終末はシュワン細胞の突起にはさまれた活性帯を含むコンパートメント構造になっている(クフラーら 1988, pp. 266-267; Nicholls et al. 1992, pp. 192-193; 辻 1995)。



図I-7 A. ヘビの終板。骨格筋繊維上で運動神経は分かれてシナプスポタン(Synaptic bouton)を形成する。イセエビやザリガニなどの神経筋接合部シナプスもこのようなシナプスポタンを形成している。B. カエルの心臓の神経節細胞上のシナプスポタン。どちらもカエルの神経筋接合部のシナプスとは異なった形態をしている。(クフラーら 1988, pp. 216)

図 I-6 にカエルの神経筋接合部シナプスを示し、図 I-7 に比較のためにその他のシナプスの模式図を示す。カエルの神経筋接合部シナプスにおける神経伝達物質はアセチルコリンである。そして、シナプス後膜には、非選択性陽イオンチャネルであるニコチン様アセチルコリンレセプターチャネルが存在している。従ってカエルの神経筋接合部シナプスは興奮性シナプスであって、抑制性の神経支配は存在しない。図 I-6 から分かるように、カエルの神経筋接合部のシナプスはひも状あるいはひもがつながった網目状になっている。このひも状の部分が神経終末(シナプス前末端)であり、1本のひも状のシナプスの中には筒状の活性帯を含むコンパートメントが 100 以上並んでいる。また、放出のトリガーを担う電位依存性の Ca^{2+} チャネルが、活性帯のごく近傍に分布している。このカエルのシナプス前末端の形態的特徴からも解るように、活性帯から流入した Ca^{2+} は軸索方向に拡散して逃げるのがほとんど不可能である。これに比べて、他のシナプスは多くが図 I-7 に示したようなボタン状の構造になっていて、このボタン一つに一つの活性帯があると考えられている。このような構造の違いはシナプス前末端中の Ca^{2+} ダイナミクスの違いを生み出すと思われる。

カエルの生体内の条件(後述の正常リンガー液中)においては、一発のインパルスによる脱分極性の局所電位(カエルの場合この局所電位は終板電位(Endplate potential: EPP)と呼ばれる)の振幅が閾値を越えているため、筋細胞にインパルスが発生して筋肉の収縮が起こる。しかし、リンガー液中の Ca^{2+} 濃度(細胞外 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_e$))を下げて、神経末端内への Ca^{2+} 流入量を減らすことで神経伝達物質の放出量を減らし、EPP 振幅が閾値を越えないように調節することができる。このように、神経伝達物質の放出量を低く抑えた条件下では、EPP 振幅は放出量に比例することが知られており、私は次章で述べる電気生理学的測定をこの条件下において行った。また、カエルの

神経筋接合部シナプスにおいては自発的な伝達物質の放出(前述のようにインパルスの到達とは非同期的にシナプス小胞1個が開口放出する現象)がかなりの頻度(~0.5 Hz)で起こる。この自発的な伝達物質の放出による EPP は微小終板電位(Miniature endplate potential: MEPP)と呼ばれる。

上記のような、放出量が EPP 振幅に比例する条件下での EPP 測定の結果から、カエルの神経筋接合部では、神経刺激後の神経伝達物質の放出の増大(短期可塑性)が起る事が知られており、その刺激後の増大はその減衰の時定数により4つの成分に分けられ、時定数の短い方から、速い促進(fast facilitation, $\tau \sim 50$ ms)、遅い促進(slow facilitation, $\tau \sim 400$ ms)、増進(augmentation, $\tau \sim 7$ s)、増強(potentiation, τ 数十秒から数分)と呼ばれている(Zengel & Magleby 1982; Tanabe & Kijima 1992)。我々のグループは以前の研究により、 Ca^{2+} キレーターであるBAPTAをシナプス前神経末端に負荷した場合、速い促進は完全に消失するがそのほかの3つの成分はほとんど影響を受けないことを示した。このことから、速い促進は、前述の残存 Ca^{2+} に直接関係があると思われるが、残りの3つの成分は残存 Ca^{2+} に直接的には関係はなく、速い促進の成分と比べると全く異なった Ca^{2+} 依存性があると考えられる(Tanabe & Kijima 1992)。しかし、カエルの神経筋接合部においては $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の正確な測定が困難であったためにシナプス伝達の可塑性と Ca^{2+} との関係についてまだまだ議論の的となっている。

これらの機構は、他の動物(特に無脊椎動物)の神経筋接合部のシナプスにおいては異なっているようである。ザリガニでは、BAPTA は神経伝達物質の放出自身を止めてしまうようであるし(カエルの場合は EPP 振幅は BAPTA 負荷により小さくなる場合もあるが、影響を受けない場合もある(Tanabe & Kijima 1992))、紫外光を当てる事によって Ca^{2+} 濃度を高めることができるケ

イジド試薬を用いた実験や $[Ca^{2+}]_i$ を蛍光測定した実験では $[Ca^{2+}]_i$ が増進の成分と直接比例しているという結果が示されている (Delaney & Tank 1994; Kamiya & Zucker 1994)。このような、動物による違いはシナプスの形態(放出部位の配置のされ方や、放出部位と Ca^{2+} チャネルとの位置関係)の違いによるところが大きいと思われる(cf. 図 I-7)。

また、ヤリイカの巨大シナプスにおいても、EGTA (Ca^{2+} キレート剤の一種であり、BAPTAに比べ Ca^{2+} に対する結合・解離の速度が遅い)をシナプス前末端に負荷しても影響を受けなかったが、BAPTAを負荷すると伝達物質の放出が減少した、という報告がある(Adler et al. 1991)。

中枢神経系においても、いくつかの種類シナプス伝達の短期可塑性がみられ、それらは脳内の情報処理において重要な役割を担っているものと考えられている(cf. Regehr et al. 1994)。それゆえ、シナプスの短期可塑性の機構を明らかにすることは大変重要なことである。

I-8. 今回の研究の目的

神経伝達及び、神経系の情報処理にはシナプスが重要な役割を担っている事は明らかであるが、その機構については不明の点が多く残されており、まだ議論の余地のある事を今まで述べてきた。

そこで、今回の研究ではカエル神経筋接合部のシナプスを用いて、神経伝達物質の放出機構及びシナプス伝達の可塑性の機構を調べるために、第一に神経刺激による伝達物質の放出を特異的に増加させるトリニトロベンゼン誘導体のシナプス伝達に対する影響を調べ (Osanai et al. 1995, *in press*)、第二

に、伝達物質の放出機構とその短期可塑性に直接関係しているシナプス前末端内の Ca^{2+} 濃度を Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いて測定した。

§ II カエル神経筋接合部における シナプス伝達機構へのトリニトロ ベンゼン誘導体の伝達物質放出増 大効果

II-1. 序

多くの試薬や毒が神経伝達物質の放出に影響を与えるということが知られている(*cf.* Kijima & Tanabe 1988; Burgoyne & Morgan 1995)。神経伝達物質の放出に特異的に影響を与える試薬の作用を調べることは伝達物質の放出の機構を理解する手掛かりを与えてくれる。我々のグループの以前の研究において、アミノ基修飾試薬である、2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid (TNBS) を数 mM の濃度でリンガー液に溶かしカエルの神経筋接合部に投与すると、インパルスと同期した神経伝達物質の放出が増大し、自発的な放出の頻度が非常に増加することを示した(図 II-1)(Tanabe et al. 1987; Kijima & Tanabe 1988)。また、 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA をシナプス前末端に負荷しても、TNBS が EPP 及び MEPP に与える効果は変化しなかった。このことから、TNBS は Ca^{2+} 非依存性に放出を増大させたことが示唆された。しかし、TNBS (5 mM) による EPP 振幅の増大はわずか 2~3 分でピークに達し、その後元のレベルに向かって減衰していった(図 II-1)。つまり、この試薬の効果は、急速な伝達物質の放出の増加とそれに続くゆっくりとした減衰の二相性であった。またこの試薬は、洗い流された後でも、数十分間はその増加の効果がある程度持続することが解っている(Data not shown.)。しかしながら、

TNBS のどの部分が伝達物質の放出に影響を与えているのか、TNBS のアミノ基修飾作用がこれらの効果の基となるものかどうかは、不明のままであった。

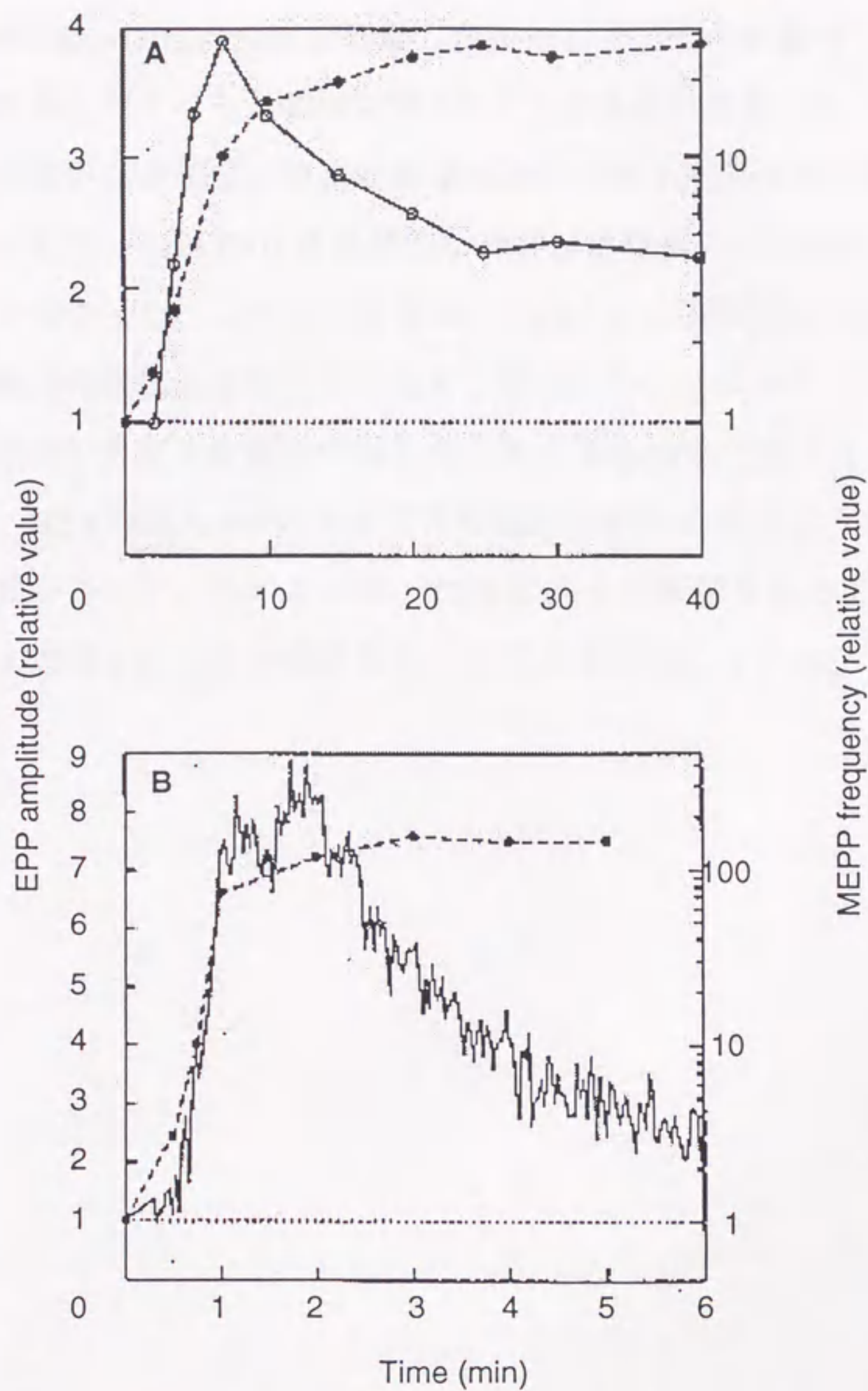


図 II-1 2 mM (A), 5 mM (B) の TNBS を灌流した時の EPP 振幅(○ 及び実線)と MEPP 頻度(● 及び破線)の対照に対する変化を示す。どちらの場合も EPP 振幅は一旦大きくなった後対照の値に向かって減少してゆ

く。一方 MEPP 頻度は増加したままである。横軸の時間は TNBS 灌流開始からの時間を示し、縦軸は左右とも対照の値との比を示している(Kijima & Tanabe 1988)。

今回の研究で私は、アミノ基を修飾するために必要な TNBS のスルホン酸基を 2-hydroxyethylamino 基で置換した 1-(hydroxyethylamino)-2,4,6-trinitrobenzene (HEATNB) を合成した。そして、この試薬をカエルの神経筋標本に投与したところ、TNBS の時のような減衰の相無しに、インパルスと同期した神経伝達物質の放出を非常に増大させる効果を持つということを見出した。また、HEATNB は自発的な神経伝達物質の放出頻度をわずかにしか増加させなかった。これらの結果は、TNBS による伝達物質放出の増加がアミノ基修飾作用によるものではなく、TNBS のトリニトロベンゼン (TNB) の部分がシナプス前膜に作用したことによる効果であることを示している。また、HEATNB は4つのシナプスの短期可塑性の成分のうち増進の成分を顕著に減少させた。このことは、TNB の部分が影響を与えている機構が増進を起こす機構と同じものを含むということを示唆している。

II-2. 実験方法

トノサマガエル (*Rana nigromaculata*) の縫工筋(sartorius muscle)の神経筋標本を用いて実験を行った。その縫工筋及び縫工筋を神経支配している神経を電気刺激ができるように、神経軸索をつけたままとり出し、プラスチック製の実験槽(容積 ~ 8 ml)に載せて、低カルシウムリンガー液を1 ~ 2 ml/min の速さで灌流しながら実験を行った。全ての実験は温度を 22 ± 0.5 °C に制御して行われた。

用いたリンガー液の組成は以下の通りである。

正常リンガー液: 112 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5mM glucose, 0.03 mM choline-Cl, 5mM HEPES-Na (pH 7.5) (Zengel & Magleby 1982; Tanabe & Kijima 1992)

測定時は低カルシウムリンガー液を用いたが、その組成は CaCl₂ を 0.3 ~ 0.7 mM まで濃度を下げ、MgCl₂ を 5 mM 加えたことをのぞけば正常リンガー液と同じ組成である。試薬は、特に述べない限り全て低カルシウムリンガー液に溶かして投与した。

II-2-1. 電気生理の手法

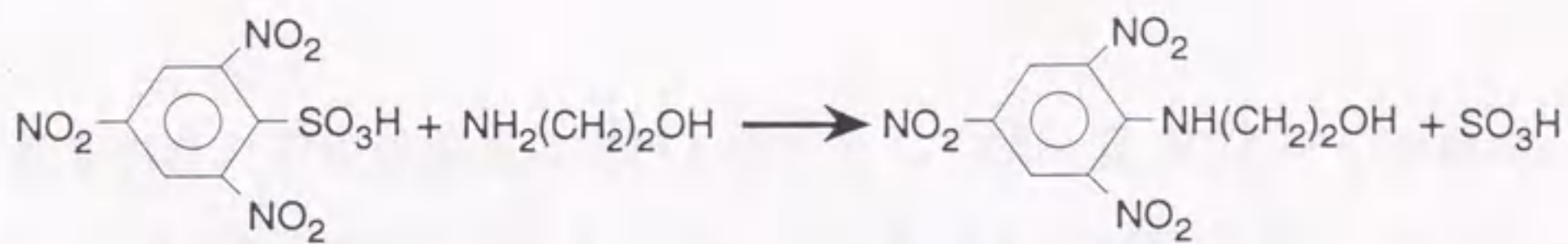
縫工筋を神経支配している神経軸索に一对の白金 - イリジウム電極を押し当て、5 ~ 50 V × 100 μs の電気刺激を後述する様々なパターンで与えて、インパルスを発生させ、そのときの EPP の測定を2種類の EPP 記録法を用いて行った。ほとんどの実験においては、EPP は終板領域に押し当てられた表面

記録電極を用い、細胞外記録により得られた。この電極は、先端を火で丸めた内径 0.2 ~ 0.4 mm のガラス電極で、その中に低カルシウムリンガー液を充填して用いた。表面記録法は、いくつかの終板からの応答を加算したものが記録されるので、細胞内記録法に比べてデータの揺らぎが少ない。また、細胞に傷をつけないので、長時間の安定した記録を取ることが可能である (Magleby 1973; Tanabe & Kijima 1992)。細胞外記録法で測定される電位差は、電極を押し当てることによって電極外周部と筋肉が接触して生じる抵抗を流れる電流(EPC, 終板電流)による電圧降下である。前述のように放出量が低く調節されている条件においては、これが放出量に比例することはすでに確かめられている (Magleby & Stevens 1972; Tanabe & Kijima 1992)。

MEPP の記録といくつかの EPP の記録は、3 M KCl を充填したガラス微小電極(電極抵抗: 3 ~ 10 M Ω)を筋繊維の終板領域に刺入した細胞内記録法で行った (Tanabe & Kijima 1992)。細胞内記録法で得られた EPP と MEPP の振幅は、アセチルコリンレセプターチャンネルを持っているシナプス後膜(筋細胞の細胞膜)の逆転電位が -5 mV であると仮定して、筋細胞の膜電位変化の補正をした (Martin 1955)。

II-2-2. 1-(hydroxyethylamino)-2,4,6-trinitrobenzene(HEATNB) の合成

2 mmol の 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid sodium salt (TNBS-Na) と 5 mmol の 2-aminoethanol を約 20 °C の純水中で約 20 分間反応させた (cf. Means and Feeny 1971)。その反応式は以下の通りである。



図II-2 TNBS と 2-aminoethanol の反応

反応が完了した後、1N HCl を滴下して最終的に pH ~ 4 程度にし、HEATNB の結晶を析出させた。この結晶を濾過して集め、冷却した純水で一度洗浄してから、デシケーター中の P₂O₅ 上で乾燥させた。元素分析を行った結果この結晶の元素組成は以下通りである事が分かった: 20.45 ± 0.03 % N, 35.24 ± 0.03 % C, 2.86 ± 0.02 % H (平均値 ± S.E.M. n=3)。この組成は、HEATNB の化学式より得られる元素の組成と一致している。また、HEATNB の融点は 106.5 ~ 108.0 °C であった。

II-2-3. 神経末端への BAPTA の負荷

BAPTA, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) の dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液 20 μl を正常リンガー液中にとかして全量を 4ml とした溶液(BAPTA-AM の最終濃度は 0.25 mM)に神経-縫工筋標本を浸して、29 °C で 2.5 時間インキュベートし BAPTA を負荷した。その後、神経筋標本を実験用の実験槽にセットし、低カルシウムリンガー液を 30 分間以上灌流して標本を洗浄した。

II-2-4. データ解析

測定された電圧は適当に増幅し直接もしくは一旦 PCM データレコーダー (Instrutech VR-100B) に記録した後に A/D 変換し、パーソナルコンピュータ (NEC PC-9801 または EPSON PC386) に取り込んで処理した。神経刺激のパターンは別のパーソナルコンピュータで生成させ D/A 変換して与えた。

シナプスの短期可塑性のうち減衰の速い成分である促通は、図 II-3 に示すように 100 Hz 10 回の連続刺激中の EPP 振幅の変化として見積もった。促通指数, I_{f_2} は、連続刺激中の 1 回目の EPP と 2 回目の EPP の振幅の比であり、 $I_{f_{10}}$ は 1 回目の EPP の振幅と 9 回目と 10 回目の EPP の振幅の平均値の比で、以下のように定義した(図 II-3)。

$$I_{f_2} = \left(\sum_{r=1}^n EPP_{2,r} \right) / \left(\sum_{r=1}^n EPP_{1,r} \right) - 1, \quad (\text{II-1})$$

$$I_{f_{10}} = \left\{ \sum_{r=1}^n (EPP_{9,r} + EPP_{10,r}) / 2 \right\} / \left(\sum_{r=1}^n EPP_{1,r} \right) - 1, \quad (\text{II-2})$$

ここで、 $EPP_{i,r}$ は r 回目の連続刺激中の i 番目の EPP 振幅で、100 Hz 10 回の連続刺激は 30 秒間隔で 10 回与えて平均した ($n=10$)。 I_{f_2} はほとんどが速い促通の成分で、遅い促通の成分はほとんど含まれていない。 $I_{f_{10}}$ は速い促通の成分(約 80%)と遅い促通の成分(約 20%)が含まれていて、短期可塑性のうち遅い成分である増進と増強の成分は、ほとんど含まれていないことが、以前の我々のグループにおける研究で示されている (Tanabe & Kijima 1992)。

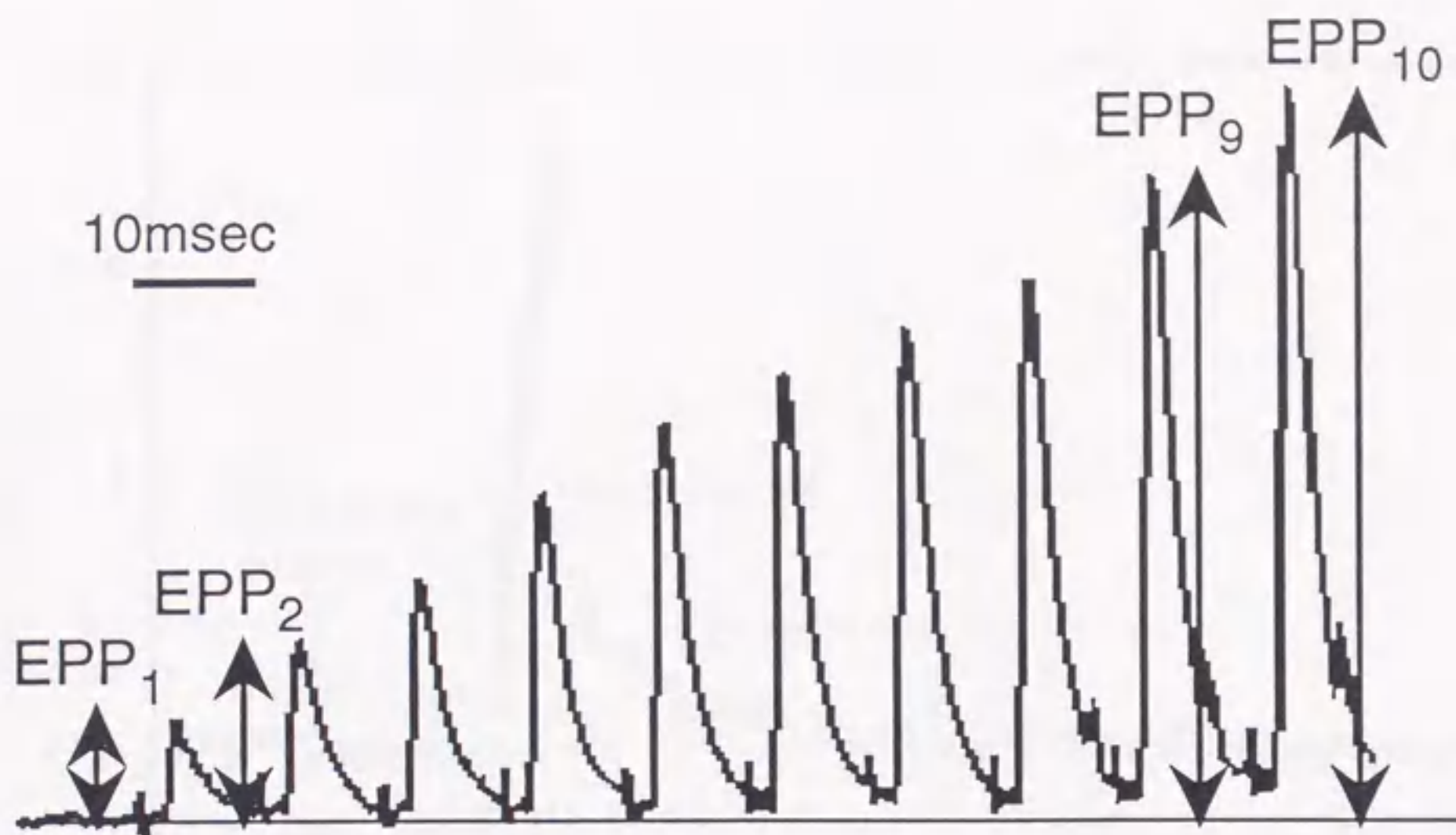


図 II-3 連続刺激により得られた EPP。10ms 間隔で10回刺激した時の EPP の変化の様子。記録は連続刺激を10回行って加算平均したものである。

増進と増強は以下のようにして計測された。まず、100 Hz 10 回の連続刺激を与えて促進指数を調べ、続いて 4 秒おきに 30 回のテスト刺激を与えて対照の EPP 振幅を得た。次に、20 Hz 450 回の条件刺激を与えて、続いて 1.5 秒間隔で 6 回、4 秒間隔で 90 回テスト刺激して、EPP 振幅を測定した(図 II-4)。このパターンを同じ終板領域で約 20 分おきに 6~12 回繰り返し、それらの結果を平均して EPP 振幅を得た。

促進、増進、増強は次のように積の関係で表されることが知られている:

$$EPP / EPP_0 = (F + 1)(A + 1)(P + 1), \quad (\text{II-3})$$

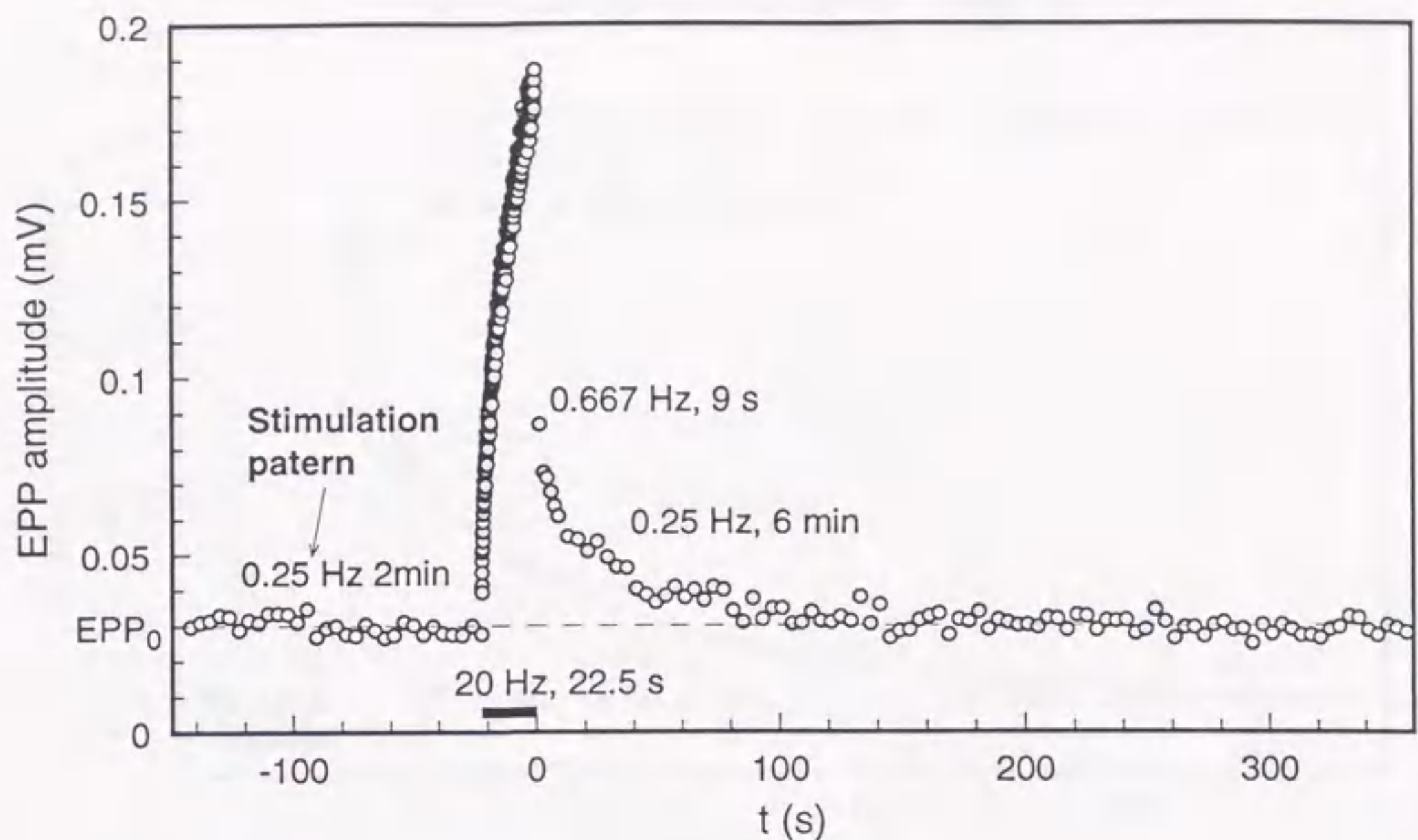


図 II-4 実際の条件刺激とテスト刺激の様子。条件刺激の前に 0.25 Hz で 2 min 刺激して、条件刺激の前の対照の値(EPP_0)を求めた。その後、20 Hz 450 回の条件刺激を行い、条件刺激の最後から 1.5 s 後から、0.667 Hz 9 s, 0.25 Hz 6 min のテスト刺激を行って、EPP 振幅の減衰を調べた。実際に増進・増強などの短期可塑性を調べる場合には EPP 振幅の代わりに EPP_0 で規格化した値(EPP/EPP_0)を用いた。

ここで EPP はテスト刺激による EPP 振幅、 EPP_0 は条件刺激の前の対照の EPP 振幅、 F は速い促進と遅い促進両方を含めたもの、 A は増進、 P は増強である(Zengel & Magleby 1982; Tanabe & Kijima 1992)。条件刺激の最後から、最初のテスト刺激が与えられる 1.5 s 後までに、促進は無視できるほど小さくなっているため、この刺激パターンの条件下では、(II-3)式は次のように書き直すことができる(図 II-5):

EPP amplitude after tetanus

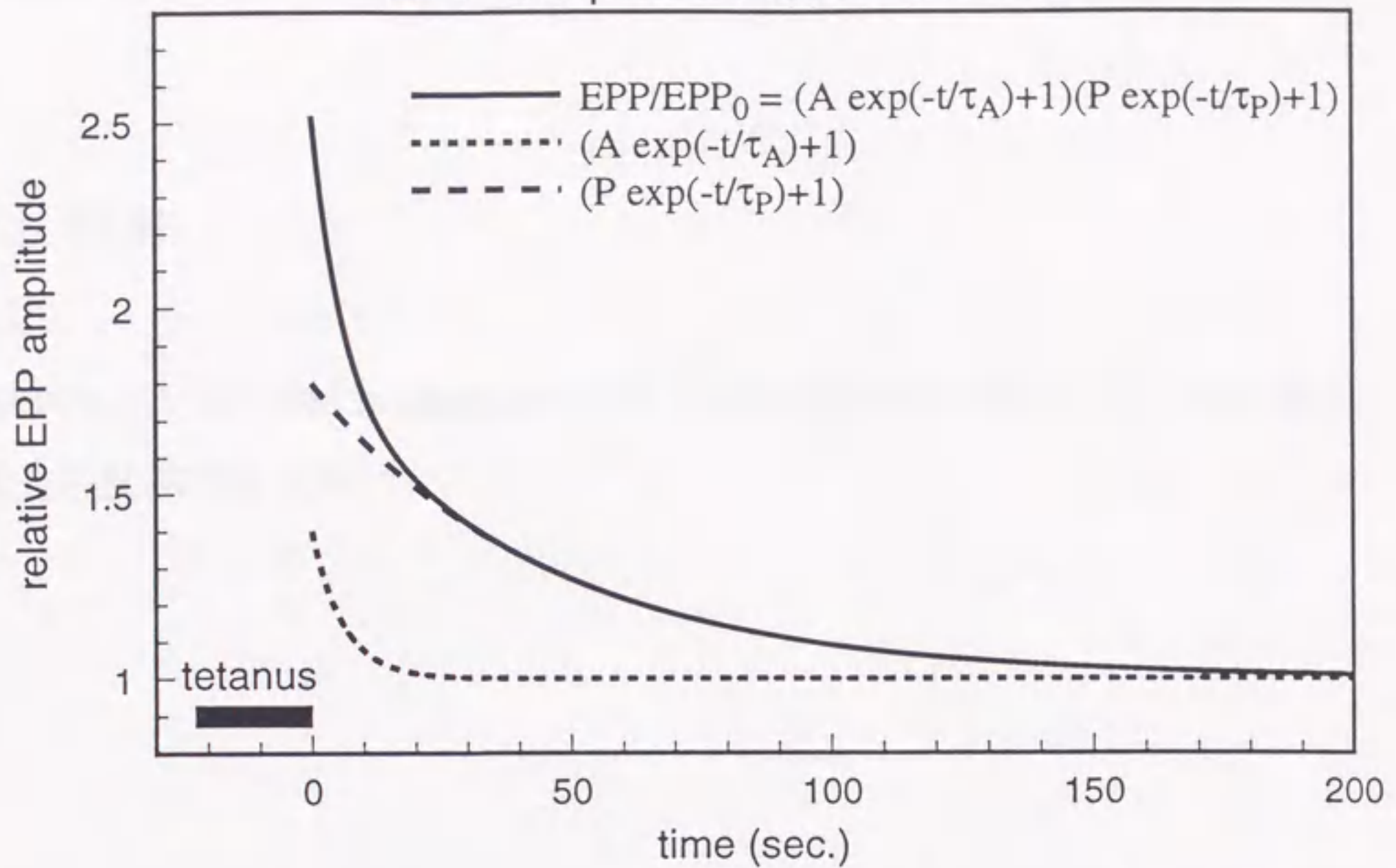


図 II-5 連続刺激後のEPP振幅の変化(実線)とそれから得られた増進の成分(点線)と増強の成分(破線)の模式図

$$EPP(t) / EPP_0 = (A(t) + 1)(P(t) + 1) \quad (II-4)$$

ここで、 $EPP(t)$ は条件刺激の最後の刺激から t 秒後のテスト刺激に対する EPP 振幅、 EPP_0 は条件刺激前の対照の EPP 振幅で、 $A(t)$ と $P(t)$ はそれぞれ時刻 t ($t=0$ は条件刺激の最後の刺激が与えられた時)での増進と増強の大きさで、以下のように表される:

$$A(t) = A(0) e^{-t/\tau_{Aug}}, \quad (II-5)$$

$$P(t) = P(0) e^{-t/\tau_{Pot}}, \quad (II-6)$$

ここで、それぞれの τ は、それぞれの成分の減衰の時定数である。

II-2-5. 試薬

BAPTA-AM (50 mM in DMSO) は同仁化学研究所から購入した。他の薬品は和光の試薬特級を用いた。



II-3. 結果

II-3-1. HEATNBがEPP振幅及びMEPP頻度に与える効果

0.15 mM の HEATNB を低カルシウムリンガー中の神経筋標本に灌流して投与すると、神経刺激によって生じる EPP 振幅は徐々に増加し、約20分後にはほぼ一定の値に達し、対照の約4倍にまで増加した。この効果は、図 II-6 に示すように試薬を投与している間持続し、試薬を洗い流すと、約20分以内に徐々に対照のレベルまで戻った。

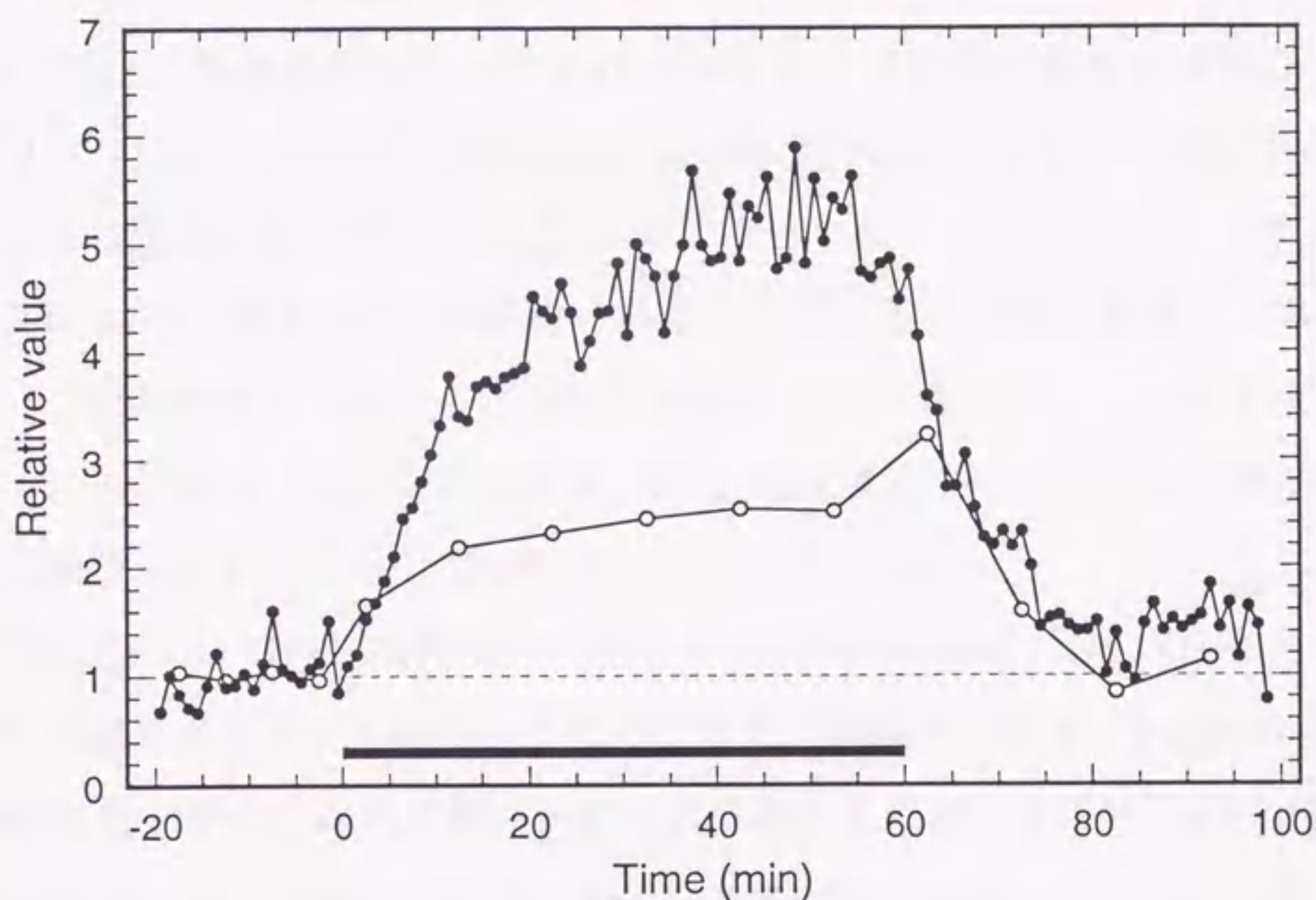


図 II-6 HEATNB 0.15 mM が EPP 振幅(●)と MEPP 頻度(○)に与える効果の時間経過。このデータは細胞内記録法で得られた。HEATNB は低カルシウムリンガー液中に溶かして灌流した。EPP 振幅のそれぞれの点は 4 秒おきの 15 個の EPP 振幅の平均値である。MEPP 頻度のそれぞれの点はその点より 5 分間の MEPP 頻度である。この時の対照の EPP 振幅は 0.444 ± 0.016 mV、MEPP 頻度は 0.520 ± 0.012 Hz であった。また、この時の $[Ca^{2+}]_e$ は 0.54 mM であった。x 軸と平行な黒いバーは 0.15 mM の HEATNB を投与していた期間を示している。

最大の EPP 振幅と対照の振幅との比の平均は 4.00 ± 0.38 (mean \pm S.E.M.; $n = 12$)であった。HEATNB は投与している間中持続する EPP を増加させる効果を持っていることは、TNBS が EPP 振幅に関しては、増加させる効果と減少させる効果の二相性を持っている(図 II-1, Kijima & Tanabe 1988)のと大きく異なる。

また、一般に、EPP 振幅を数倍に増加させる試薬は MEPP 頻度を数十倍以上に増加させるのに対し、HEATNB は EPP 振幅を著しく増加させたにもかかわらず、自発的な MEPP の頻度はほとんど増加させなかった(対照に対する比は 1.89 ± 0.25 (mean \pm S.E.M.; $n = 4$))。しかし、その増加の時間経過は EPP 振幅のそれと似ていた(図 II-6)。

0.25 Hz で神経刺激を行っても HEATNB による MEPP 頻度の増加には変化がなかった(図 II-6)。膜の回収(endocytosis)は神経刺激によって促進されるので、もし膜の回収の際に HEATNB が取り込まれているとすると、HEATNB による MEPP 頻度の変化は刺激のあるなしによって変化するはずである。しかし、刺激の有無に関わらず MEPP 頻度の変化の度合いがほとんど変わらなかったことから、膜の回収による HEATNB の細胞内への導入が HEATNB の効果の発現にとって重要でないことを示している。

HEATNB が MEPP 頻度を余り増加させないということは、TNBS や他の EPP 振幅を増加させる試薬の効果とは著しく対照的である。2 mM の TNBS の場合 EPP 振幅は対照に比べ 4 倍にまで増加するが、その時 MEPP 頻度の増加は 20 倍以上にもなる(図 II-1, Kijima & Tanabe 1988)。

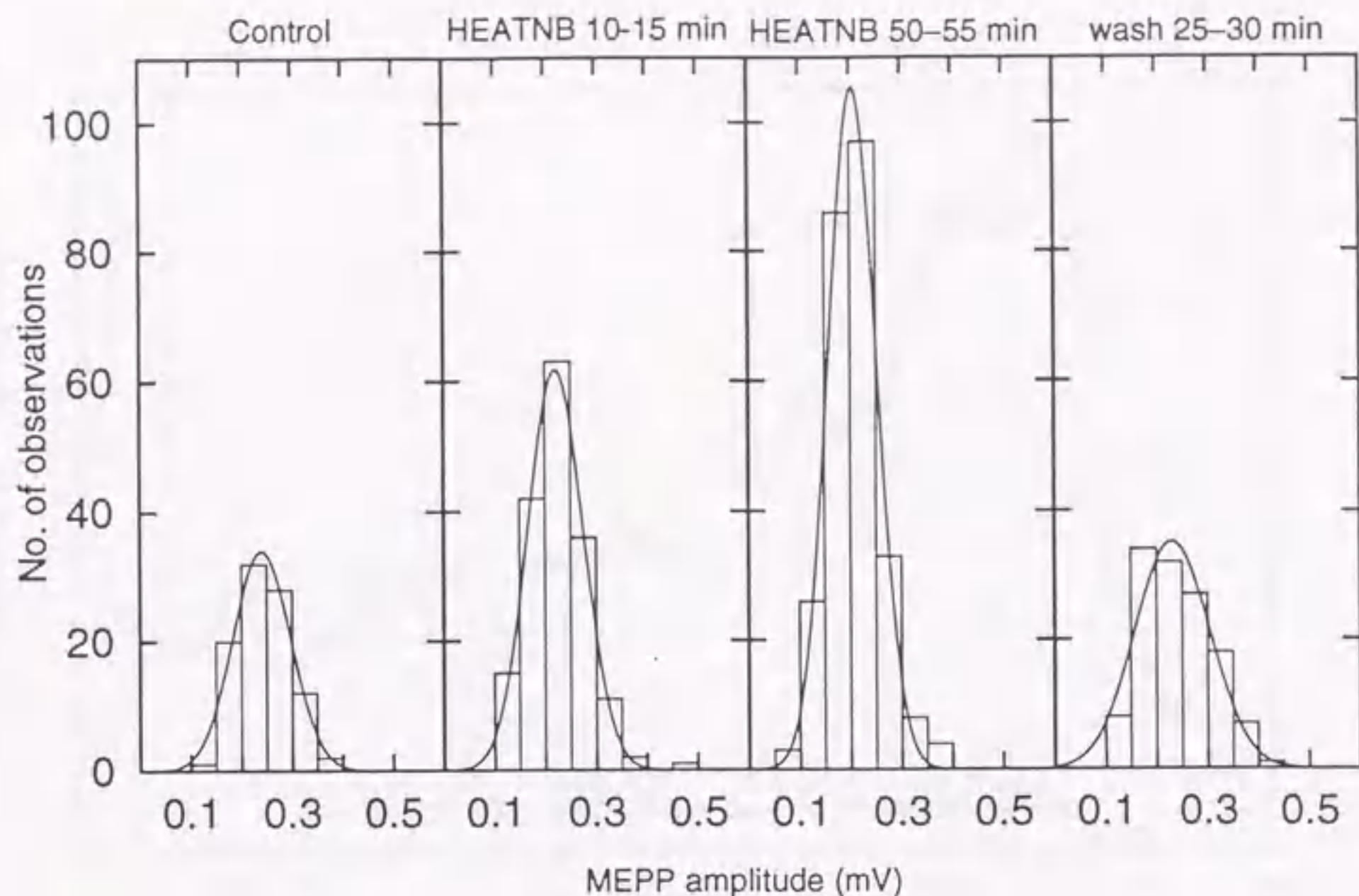


図 II-7 0.15 mM HEATNB を投与する前後の MEPP 振幅の分布。このデータは、細胞内記録法で、同じ終板から得られた。この図における MEPP の振幅の平均値は次の通りである: 0.246 ± 0.050 (対照), 0.224 ± 0.056 (HEATNB 10-15 min), 0.208 ± 0.051 (HEATNB 50-55 min), 0.239 ± 0.067 (洗浄後 25-30 min)(mean (mV) \pm S.D.)。[Ca²⁺]_e は 0.42 mM であった。実線はデータの標準偏差(S.D.)より得られた最適のガウス曲線である。

図 II-7 は HEATNB を投与する前とした後の MEPP 振幅の分布の典型的な一例を示している。もし、HEATNB がシナプス後膜(筋繊維)に影響を与えて EPP 振幅が変化したとすると、同じ伝達物質の量に対する EPP の大きさが変化するはずである。自発的な神経伝達物質の放出はシナプス小胞 1 個が開口放出を起こして起るものと考えられているので、放出量はいつもほとんど一定である。つまり、EPP 振幅の増大がシナプス後側に原因があるのか、シナプス前側に原因があるのかを調べるには MEPP 振幅の分布の変化を調べれば良い。今回の場合、図 II-7 を見て分かるように MEPP 振幅の分布が変化していないので、TNBS と同じように HEATNB もシナプス後膜での応答には影響を与えていないということが結論される(Kijima & Tanabe 1988)。

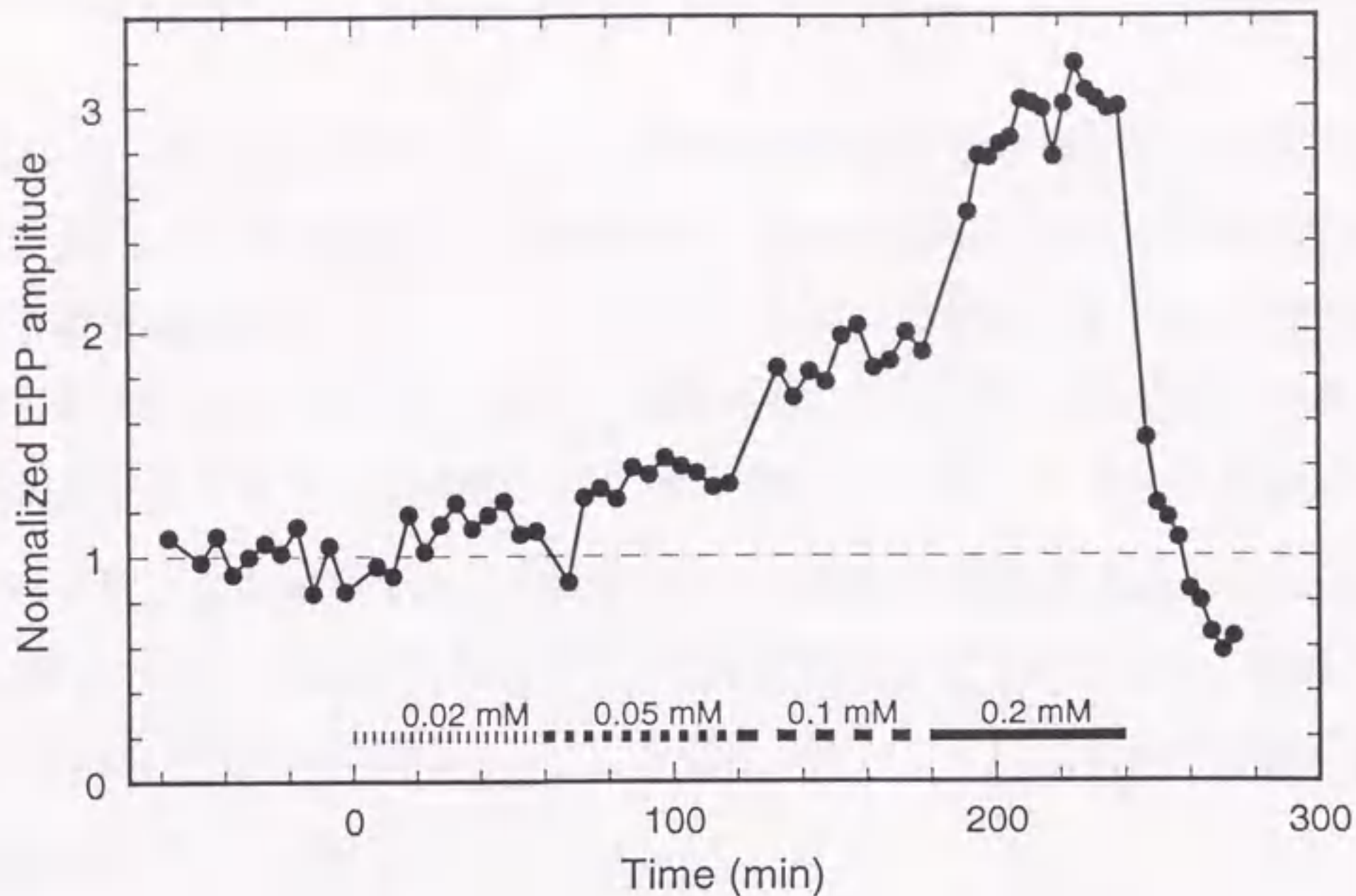


図 II-8 EPP 振幅の HEATNB 濃度依存性。それぞれの点は 0.25 Hz で刺激した時の細胞外記録法で得られた 10 個の EPP 振幅の平均値である。対照の EPP 振幅は 0.0335 ± 0.0010 mV で、 $[Ca^{2+}]_e$ は 0.45 mM であった。水平の帯は HEATNB を投与していた期間を示しており、その濃度はそれぞれバーの上に記してある。

図 II-8 は、HEATNB の濃度を 0.02 mM ~ 0.2 mM の範囲で 1 時間毎に段階的に増加させて投与した時の EPP 振幅の測定結果である。EPP 振幅は、濃度が高くなるにつれて段階的に増加していることが示されている。

これまで述べてきた HEATNB の EPP に対する効果は、TNBS による EPP 振幅の増大相と類似している。また、HEATNB は官能基を持っていないためタンパク質など他の物質と化学反応することができない。これらを考え合わせると、EPP 振幅を増加させる HEATNB と TNBS の効果は、HEATNB と TNBS が放出に関連した膜タンパクなどのアミノ基を含む残基と反応したのではなく、トリニトロベンゼン残基が放出に関連したタンパク質などの放出装置に可逆的に結合するなどして影響を与えたことによるものと思われる。

II-3-2. 細胞外カルシウム濃度を下げた条件での HEATNB の効果

HEATNB を投与することにより伝達物質の放出量が増加するため、長い連続刺激(20 Hz 450 回)を与える実験では、連続刺激中に筋収縮が起ったり伝達物質の枯渇が起ったりすることのないように、何らかの手段により放出量を減らしてやらなければならない。実際の HEATNB を投与した実験の際には試薬投与前と投与後の対照の EPP 振幅が同じぐらいになるように $[Ca^{2+}]_e$ を下げ、放出量を減らした。このカルシウム濃度の調節は Dodge & Rahamimoff (1967) によって記述された 4 乗則(I-6 節参照)を仮定して行った。図 II-9 に HEATNB を投与しながら $[Ca^{2+}]_e$ を変化させたことによる EPP 振幅の変化の結果を示す。

この図はまた、促進指数 I_{f_2} と $I_{f_{10}}$ がほとんど変化していないことを示している。このことは、HEATNB が速い促進と遅い促進のどちらにもほとんど影響を与えていないことを示す。

図 II-8 と II-9 において、HEATNB の投与をやめた時に EPP 振幅が対照レベル以下になるのは、HEATNB あるいは長時間の記録により筋細胞が悪化し膜電位が上昇したことによる見かけのものであると思われる(議論を見よ)。私は、このような長時間の記録において、試薬を投与しない普通の状態においても、EPP 振幅が減少していくことを観察している。しかし、図 II-8 や II-9 で用いられた細胞外記録法ではシナプス後(筋細胞)の膜電位の変化を測定することができないため、EPP 振幅の補正をすることができなかった。

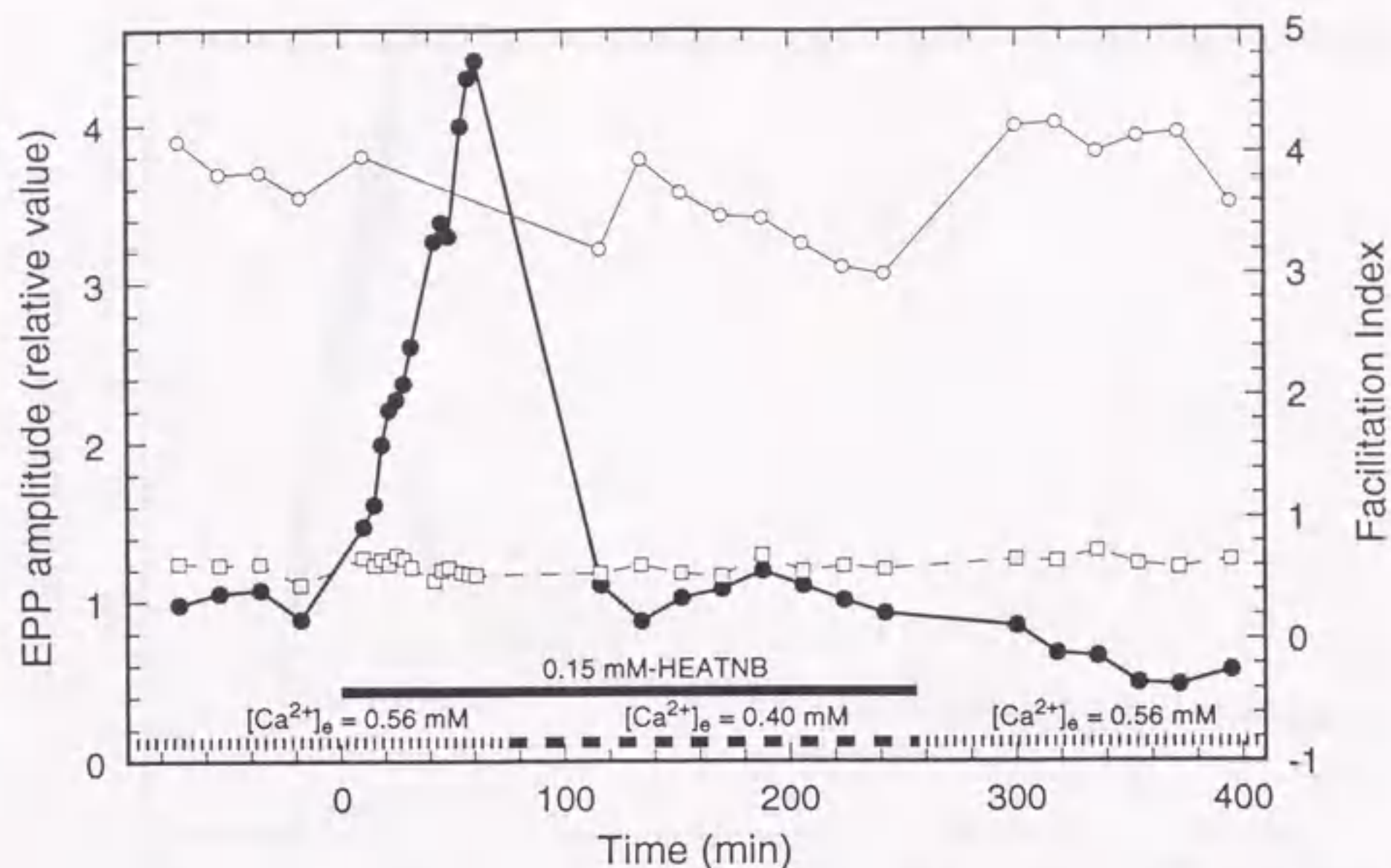
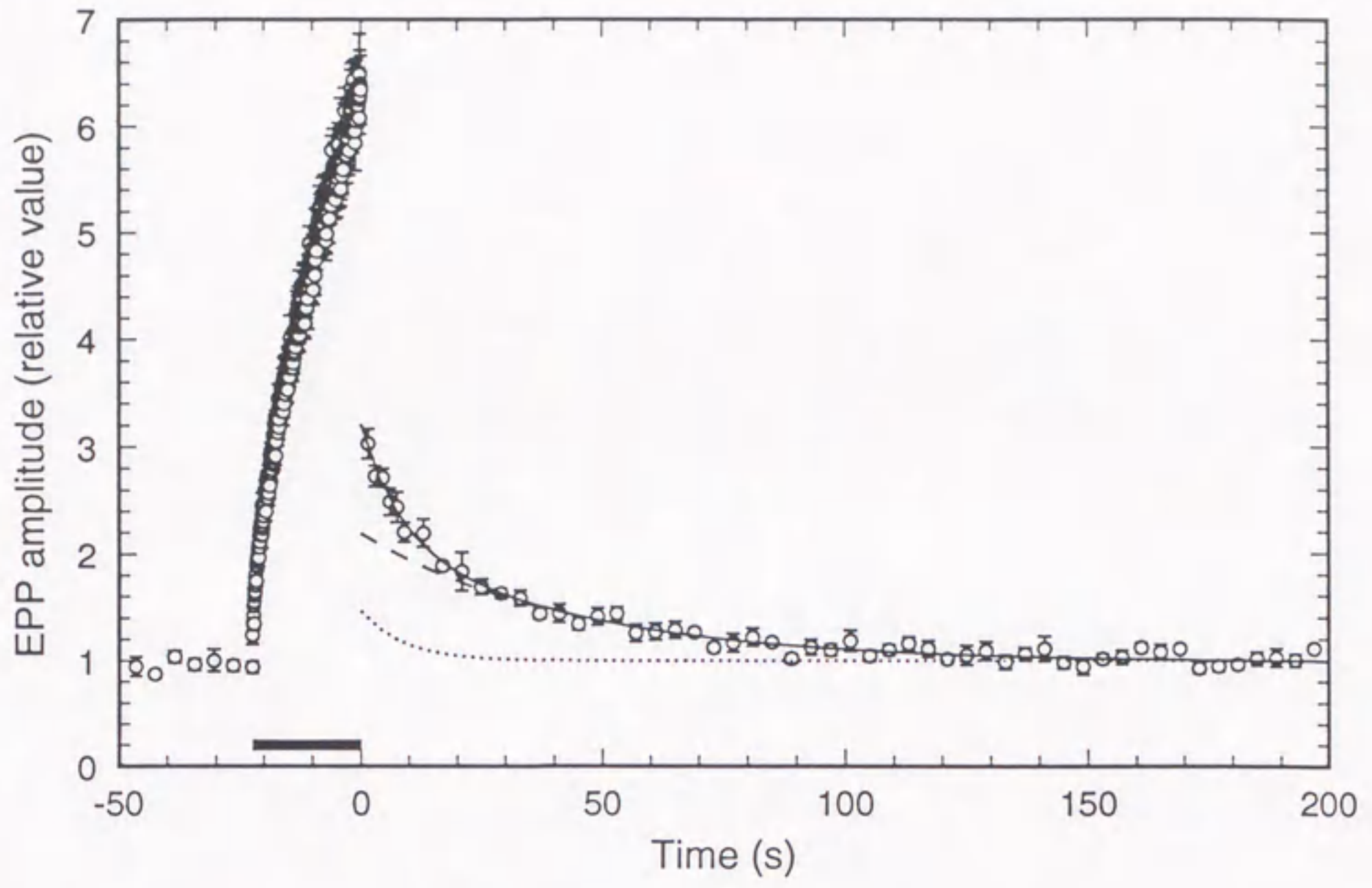


図 II-9 細胞外記録法で測定された 0.15 mM HEATNB 投与前と投与後の EPP 振幅(●)と 促通指数 (□: I_{f_2} , ○: $I_{f_{10}}$) の変化の時間経過。 $[Ca^{2+}]_e$ を下げると EPP 振幅は小さくなり、HEATNB を洗い流し $[Ca^{2+}]_e$ を元に戻すと EPP 振幅はほぼ試薬投与前のレベルに戻った。この実験の間、どちらの 促通指数 もほとんど変化しなかった。対照の EPP 振幅、 I_{f_2} 、 $I_{f_{10}}$ はそれぞれ、 0.0590 ± 0.0051 mV、 0.557 ± 0.034 、 3.77 ± 0.07 であった。増進と増強は -80 ~ 0 分(control)、110 ~ 260 分(HEATNB 存在下)、290 ~ 400 分(HEATNB 洗浄後)の3度に渡って調べた(実験方法を参考にせよ)。

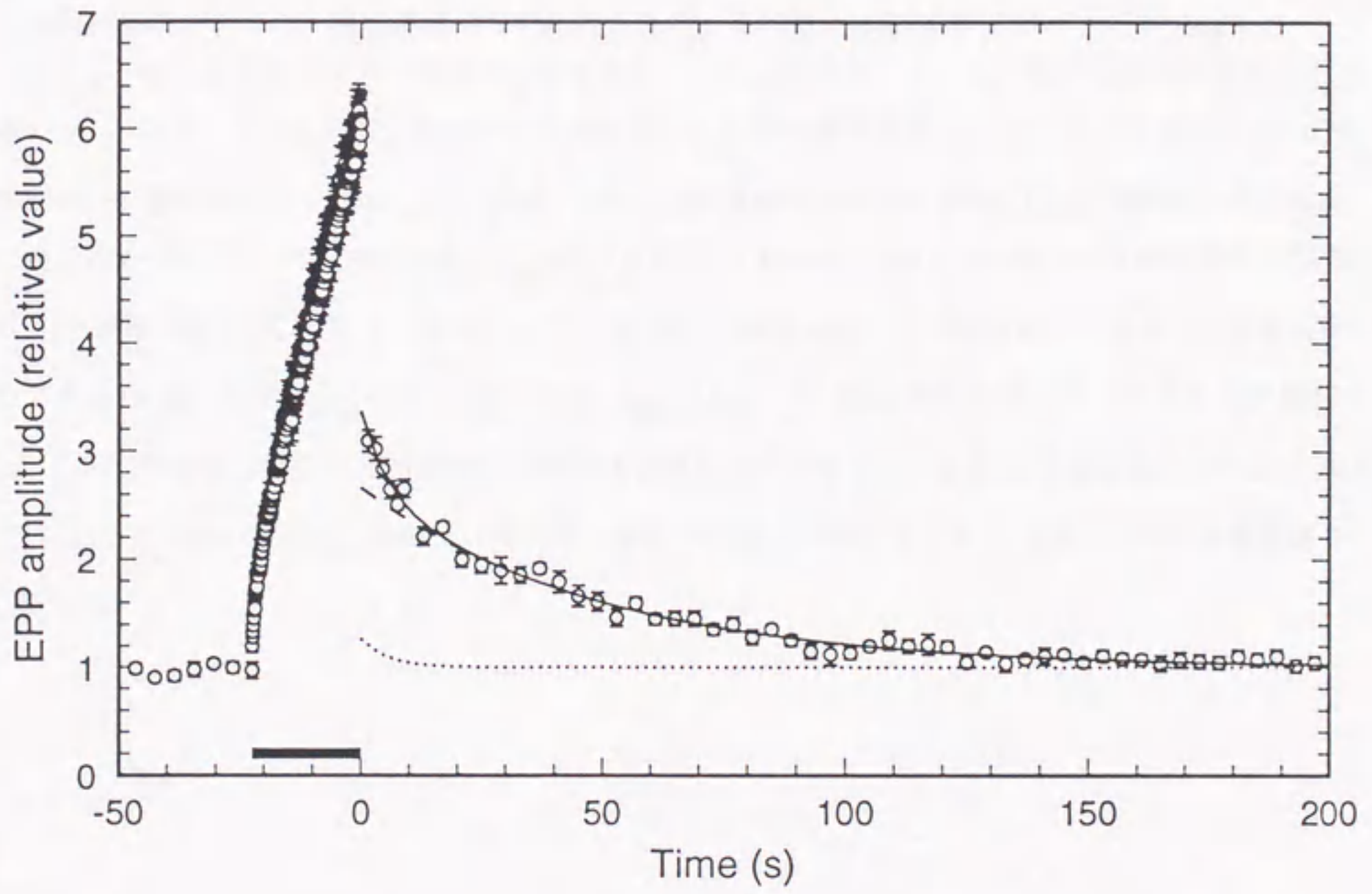
II-3-3. HEATNB が増進および増強に与える効果

図 II-10 は 0.15 mM HEATNB の投与前後で、20 Hz 450 回の連続刺激(条件刺激)を与えて、増進及び増強を調べる実験を行った結果である。HEATNB を投与すると増進の大きさが著しく減少し増強の大きさが少し大きくなった。しかし、それぞれの時定数はほとんど変化しなかった(図 II-10 B, 表 II-1)。いくつかの例では、HEATNB 投与によって増進は完全に消失した(5例中3例)。試薬を洗い流した後は増進、増強とも HEATNB 投与前の対照のレベルまでほぼ戻った(図 II-10 C)。それぞれの平均の値は表 II-1 にまとめてある。

A



B



C

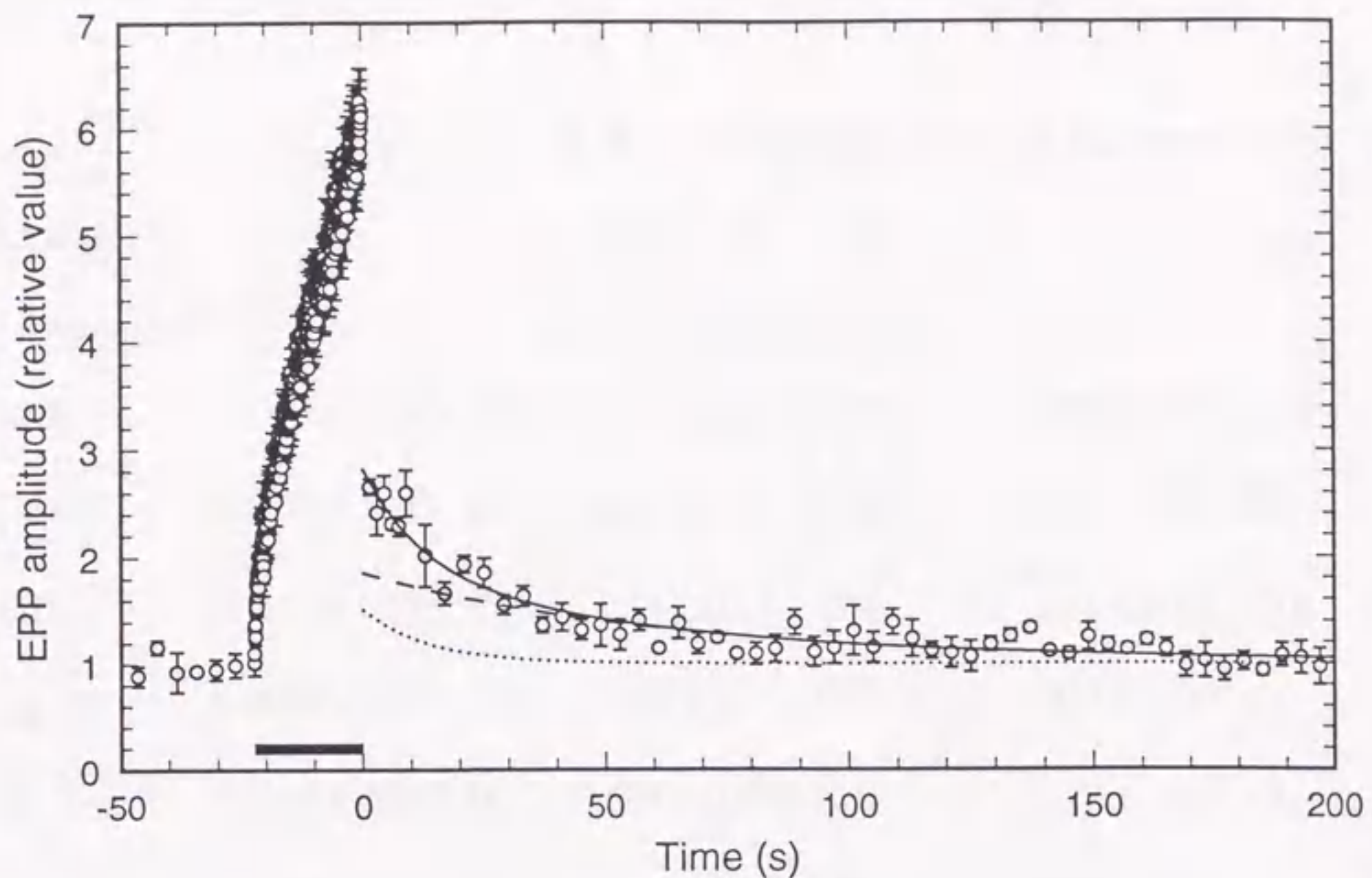


図 II-10 0.15 mM HEATNB 投与前と投与後の 20 Hz 450 回の連続刺激後の EPP 振幅の増進と増強。このデータは細胞外記録法を用いて同じ終板領域から得られた。平均値と S.E.M. がそれぞれ ○ とエラーバーで示されている。x 軸に平行な黒いバーは条件刺激を与えていた期間を示している。EPP 振幅の減衰の最適曲線を実線で示してある。A. HEATNB 投与前の連続刺激による EPP 振幅の変化を示している ($[Ca^{2+}]_e = 0.56$ mM)。対照の EPP 振幅の値は 0.0565 ± 0.0047 mV である。連続刺激後の EPP 振幅の減衰の最適曲線を定めた結果得た値は次の通りである: $A(0) = 0.46$; $\tau_{Aug} = 8.9$ s; $P(0) = 1.23$; $\tau_{Pot} = 44$ s。B. 0.15 mM HEATNB を投与した時の EPP 振幅の変化 ($[Ca^{2+}]_e = 0.40$ mM)。対照の EPP 振幅は 0.0533 ± 0.0030 mV であった。最適値は次の通りである: $A(0) = 0.26$; $\tau_{Aug} = 5.4$ s; $P(0) = 1.67$; $\tau_{Pot} = 50$ s。C. HEATNB を洗い流した後の EPP 振幅の変化 ($[Ca^{2+}]_e = 0.56$ mM)。対照の EPP 振幅は 0.0339 ± 0.0026 mV であった。最適値は次の通りである: $A(0) = 0.52$; $\tau_{Aug} = 13.7$ s; $P(0) = 0.84$; $\tau_{Pot} = 65$ s。それぞれの図の破線と点線はそれぞれ増進と増強の最適曲線である(式 II-4 ~ 6)。

表 II-1 HEATNBがシナプスの短期可塑性に与える効果

	control	0.15 mM HEATNB	ratio to the control value**
EPP amplitude*	1	4.00 ± 0.38 (12)†	—
MEPP frequency*	1	1.89 ± 0.25 (4)†	—
A(0)	0.397 ± 0.045 (5)	0.137 ± 0.087 (5)§	0.286 ± 0.181 (5)†
τ_{Aug} (s)	6.37 ± 1.15 (5)	6.90 ± 1.47 (2)§	1.46 ± 0.85 (2)
P(0)	0.811 ± 0.139 (5)	1.15 ± 0.14 (5)§	1.51 ± 0.21 (5)‡
τ_{Pot} (s)	46.2 ± 2.5 (5)	49.7 ± 1.7 (5)§	1.08 ± 0.04 (5)
I_{f_2}	0.566 ± 0.027 (8)	0.618 ± 0.036 (7)§	1.07 ± 0.05 (7)
$I_{f_{10}}$	3.72 ± 0.26 (8)	4.06 ± 0.47 (4)§	1.01 ± 0.08 (4)

* これらの行の値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げる前にそれぞれの標本から得られた対照値に対する比の平均値である。

** この列の値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げた後にそれぞれの標本から得られた対照値に対する比の平均値である。

§ これらの値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げた状態のデータから得られた。

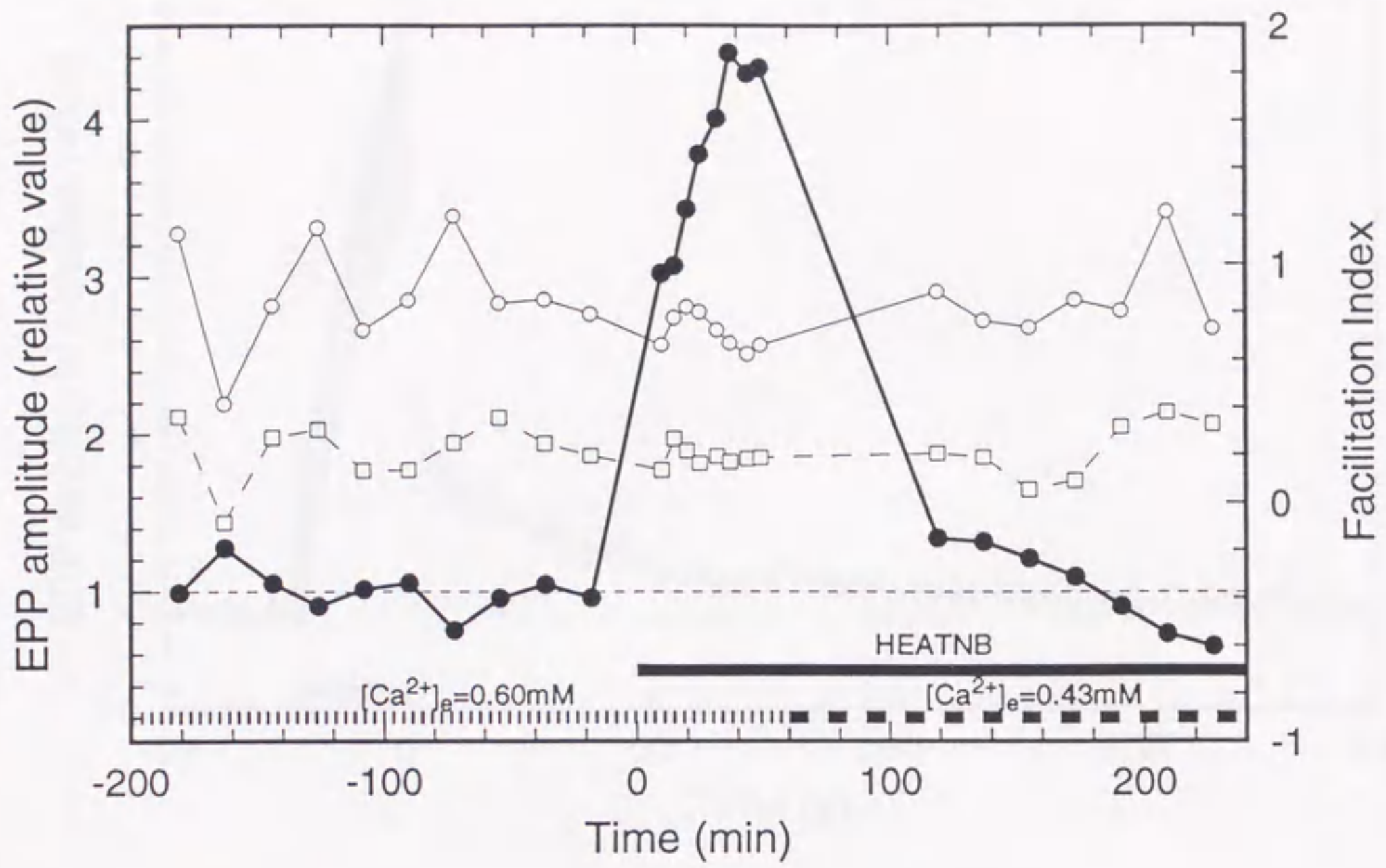
全ての値は 平均値 ± S.E.M. で表されている。(n) は実験の数を示している。

Student's t-test によるとこれらの値は 1 とは有意の差がある(†: $p < 0.005$, ‡: $p < 0.025$)。

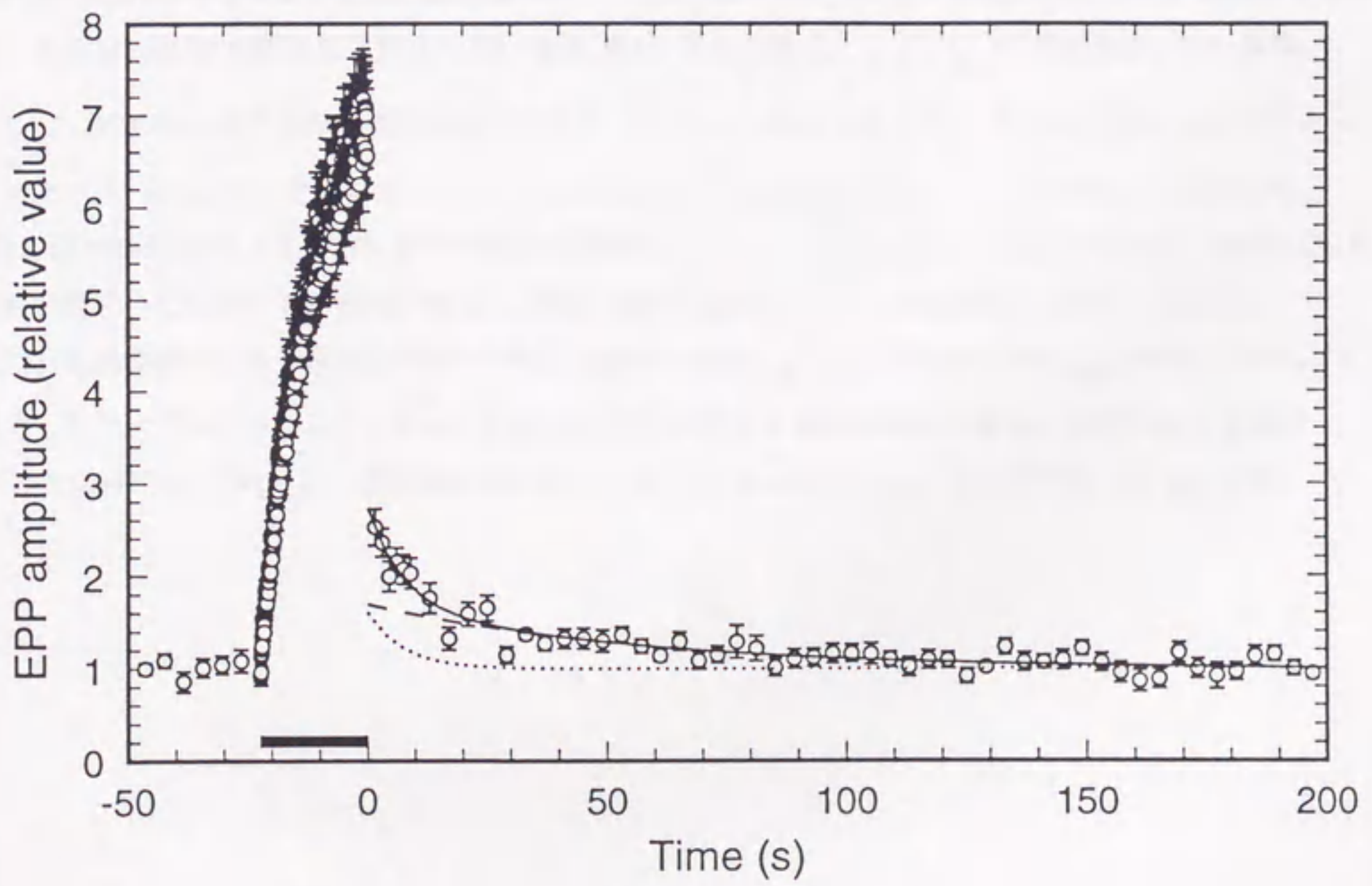
II-3-4. BAPTA で $[Ca^{2+}]_i$ をバッファーした際の HEATNB の効果

HEATNB による神経伝達物質の放出増大が静止状態での $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によるものかどうかを調べるために、 Ca^{2+} キレーターである BAPTA を実験方法に述べたような方法でシナプス前神経末端内に負荷した(Kijima & Tanabe 1988)。前述のように BAPTA 負荷によって速い促通は完全に消失する(Tanabe & Kijima (1992))。つまり、BAPTA によって Ca^{2+} がキレートされていれば促通の成分の目安となる I_{f_2} と $I_{f_{10}}$ はどちらも BAPTA を負荷していない状態に比べて小さくなるはずである。本実験においても図 II-11 A に示すように、 I_{f_2} と $I_{f_{10}}$ が低いレベルのままになっているので、BAPTA の Ca^{2+} に対する緩衝能力は実験を通して持続していると思われる。BAPTA 負荷による影響を受けることなく、HEATNB は EPP 振幅を増加させ(図 II-11 A)、増進の大きさを減少させ、増強の大きさを増加させた(図 II-11 C)。また、BAPTA を負荷していない時(図 II-8 参照)と同様に、 I_{f_2} と $I_{f_{10}}$ はどちらも HEATNB 投与により変化しなかった(図 II-11 A)。これらの結果は表 II-2 にまとめられている。これらの結果は、TNBS の EPP 増大に対する効果が BAPTA 負荷の影響を受けなかったという実験結果(Kijima & Tanabe 1988)と類似する。これらのことから、TNBS や HEATNB による放出増大効果が、静止状態での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によるものではないことが結論される。

A



B



C

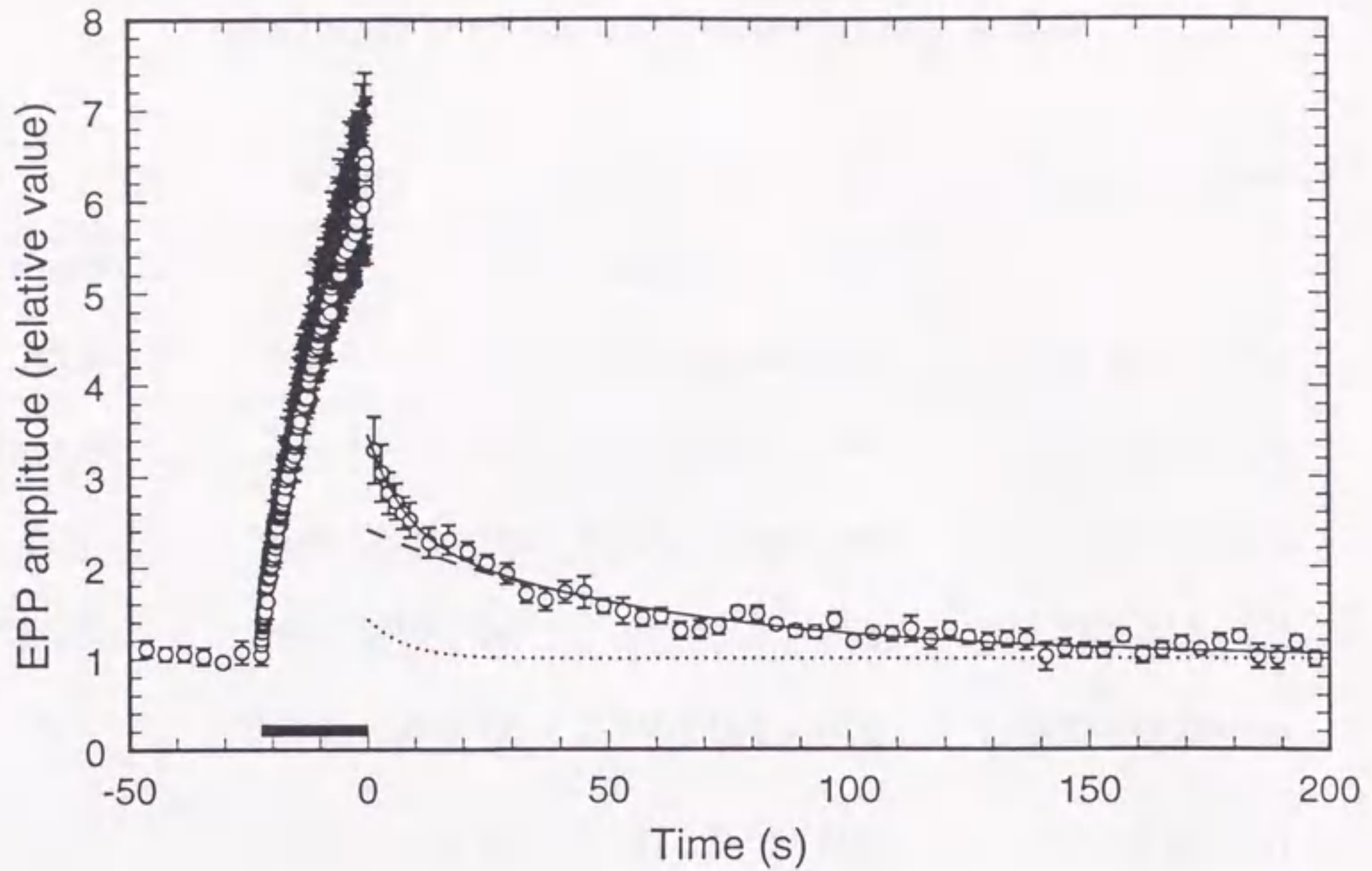


図 11-11 BAPTA を負荷した神経筋接合部での 0.15 mM HEATNB の効果。細胞外記録法により EPP 振幅を得た。A. 0.15 mM HEATNB 投与前後の EPP 振幅(●)と 促進指数(□: I_{f_2} , ○: $I_{f_{10}}$)の時間経過。EPP 振幅、 I_{f_2} 、 $I_{f_{10}}$ の HEATNB 投与前の対照の値はそれぞれ、 0.0274 ± 0.0011 mV, 0.206 ± 0.0042 , 0.852 ± 0.074 であった。残存 Ca^{2+} が BAPTA によってバッファーされるので、促進指数が低いレベルで押さえられている。BAPTA は HEATNB による、EPP 振幅の増加に影響を与えない。B. HEATNB を投与する前の、20 Hz 450 回の連続刺激を与えた時の EPP 振幅の増進と増強。連続刺激前の対照の EPP 振幅は 0.0245 ± 0.0014 mV であった。最適曲線から得た値は次の通りである: $A(0) = 0.61$; $\tau_{Aug} = 7.5$ s; $P(0) = 0.74$; $\tau_{Pot} = 60$ s。C. BAPTA を負荷したシナプスにおける、0.15 mM HEATNB 投与後の EPP 振幅の増進と増強。対照の EPP 振幅は 0.00273 ± 0.0027 mV であった。最適値は次の通りである: $A(0) = 0.43$; $\tau_{Aug} = 8.0$ s; $P(0) = 1.4$; $\tau_{Pot} = 60$ s。

表 II-2 BAPTA を負荷したシナプス前末端において、
HEATNBがシナプスの短期可塑性に与える効果

	control	0.15 mM HEATNB	ratio to the control value**
EPP amplitude*	1	3.13 ± 0.67 (3)††	—
A(0)	1.03 ± 0.15 (4)	0.693 ± 0.198 (4)§	0.663 ± 0.127 (4)†
τ_{Aug} (s)	5.61 ± 0.76 (4)	6.74 ± 0.41 (4)§	1.25 ± 0.12 (4)
P(0)	0.689 ± 0.054 (4)	0.963 ± 0.147 (4)§	1.42 ± 0.21 (4)‡
τ_{Pot} (s)	43.7 ± 7.0 (4)	53.3 ± 9.7 (4)§	1.24 ± 0.15 (4)
I_{f_2}	0.253 ± 0.040 (4)	0.236 ± 0.034 (4)§	0.937 ± 0.026 (4)
$I_{f_{10}}$	0.984 ± 0.113 (4)	1.12 ± 0.16 (4)§	1.13 ± 0.10 (4)

* この行の値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げる前にそれぞれの標本から得られた対照値に対する比の平均値である。

** この列の値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げた後にそれぞれの標本から得られた対照値に対する比の平均値である。

§ これらの値は HEATNB を投与し $[Ca^{2+}]_e$ を下げた状態のデータから得られた。

全ての値は 平均値 ± S.E.M. で表されている。(n) は実験の数を示している。

Student's t-test によるとこれらの値は 1 とは有意の差がある(††: $p < 0.005$, †: $p < 0.025$, ‡: $p < 0.05$)。

II-4. 議論

II-4-1. TNBS と HEATNB の作用の様式: 類似点と相違点

TNBS も HEATNB も、量子の大きさ(シナプス小胞一個に含有される神経伝達物質の量)やシナプス後側の機構には影響を与えずに量子数(開口放出するシナプス小胞の数)を増加させることによって、EPP 振幅を著しく増大させた。それゆえ、この放出を増加させる効果は、これらの試薬のトリニトロベンゼン残基によっているのであって、TNBS がアミノ基を修飾しているからではないと結論した。また、シナプス前末端に BAPTA を負荷した場合でも、BAPTA を負荷していない時と同じように効果があったことから、どちらの試薬の効果も静止状態での $[Ca^{2+}]_i$ を増加させることによるものではないということが示唆された。したがってこれらの試薬は神経伝達物質の放出機構に直接作用して、放出機構の Ca^{2+} 感受性を変化させるものであると考えることができる。ちなみに、HEATNB 投与により約4倍に増えた EPP 振幅を、4乗則を仮定して $[Ca^{2+}]_e$ を下げることによって対照のレベルに戻すことができたことから(図 II-9)、インパルス到達時に放出部位に流入する Ca^{2+} の量が $[Ca^{2+}]_e$ に比例すると仮定すると、神経伝達物質の放出量が放出部位での Ca^{2+} 濃度の約4乗に比例するという関係は HEATNB 投与により変化しなかったと言える。

これら二つの試薬の作用にははっきりと異なる点がある。TNBS は一過性に EPP 振幅を増大させ、しだいにその振幅を対照のレベルに向かって減少させた。この減少していく原因には、神経刺激時の Ca^{2+} 流入量の減少、ある

いは放出機構への直接の影響の二つの可能性が考えられる。残念ながら、今のところこの二つの可能性のうちどちらが正しいかを判断する情報は何も持っていない。次章で述べる $[Ca^{2+}]_i$ の測定を TNBS 投与下で行うことで、将来この問題を解決できるであろう。

これらの試薬の MEPP 頻度、すなわち自発的な(刺激と同期しない)伝達物質放出、に対する効果は全く異なっていた。TNBS は MEPP 頻度を顕著に増加させた: 2mM で 20 倍以上(この時 EPP 振幅は約 4 倍)、5 mM で約 100 倍であった(図 II-1)。これは、伝達物質放出を増加させる他の試薬あるいは状態と同様の効果である(例えば、erythrosin B (Augustine & Levitan 1983; Tanabe & Kijima 1988)、細胞外液を高張にしたとき(Fatt & Katz 1952; Tanabe & Kijima 1988))。また、EPP 振幅に対する効果とは対照的に、TNBS による MEPP 頻度の増加は減衰することなく持続した(図 II-1)。この TNBS の効果は完全に可逆的ではなかった。すなわち、洗い流した後もその効果は少なくとも数十分は続いた(Tanabe et al. 1987)。それに対して、HEATNB は TNBS と比べて極めてわずかにしか MEPP 頻度を増加させなかったし(0.15 mM のとき約 1.9 倍)、その効果は完全に可逆的であった。

この結果は、刺激と同期した放出の機構と自発的な放出の機構に違いがあり、HEATNB は特に同期した放出の機構を活性化している、ということを示唆している。最近の研究でこの放出機構の違いについていくつかの報告がある。Zengel & Sosa (1994) はカエル神経筋接合部において、連続刺激中あるいはその直後に、EPP 振幅の強力な抑制が起るが、MEPP 頻度については抑制が起らなかったことを示した。Geppert ら(1994)はシナプトタグミン-Iを発現していないノックアウトマウスの中樞神経系で、細胞外からの Ca^{2+} 流入に同期した放出はほとんど見られなくなるが、自発的な放出はほとんど影響を受けないということを示している。

HEATNB による刺激に同期した伝達物質の放出の増大効果は、インパルスによって引き起こされる Ca^{2+} の流入量が増加した結果である可能性が考えられる。しかしながら、短期可塑性の4つの成分のうち増進だけが HEATNB により大きく減少するということから、この可能性は低い。なぜならば、このような増進の減少は $[\text{Ca}^{2+}]_e$ を変化させた実験においても観察されなかったからである (Osanai, *unpublished results*; cf. Zengel et al. 1994)。

TNBS と HEATNB の作用の違いに関して次のように考えることができる。TNBS は、最初の放出を増加させる相では、刺激による放出と自発的な放出の両方に関連した共通の機構を活性化している。そして、続いて起る放出減少の相では、刺激による放出の機構に特異的に抑制的な効果を与えている。また、HEATNB は放出の共通機構には非常に弱い効果しか与えないが、刺激による放出機構を特異的に活性化する。この仮説が正しいかどうか検証するには更なる実験が必要である。

II-4-2. HEATNB が作用する場所

Kijima & Tanabe (1988) は以前、TNBS (5mM) が灌流後 30 秒以内に放出を増加させたことと、TNBS は中性では負の電荷を持ち、シナプス前膜を通過することが困難であろうことから、TNBS はシナプス前膜の細胞外側の面に作用し、開口放出(exocytosis)に重要なある膜タンパクのアミノ基と反応すると考えた(Kijima & Tanabe 1988)。MEPP 頻度の部分的な不可逆性はタンパクとの反応によるものであると考えられるが、今回の研究で TNBS による刺激に同期した放出の増大効果はアミノ基との反応が必須なのではなく、TNBS が開口放出と関連した膜タンパクと可逆的に結合することが重要であ

ることが明らかになった。HEATNBはTNBSに比べてずっと低い濃度で放出を増加させる効果を持つ(TNBSの場合約0.2 mMで効き始めるが、HEATNBは0.02 mMから効き始める)。0.2 mMより高い濃度では、筋繊維が自発的に収縮を始め、筋繊維と神経繊維の両方が死んでしまうので、0.2 mMより高い濃度のHEATNBを投与することができなかった。0.15 mMのとき、灌流を始めてから比較的長い時間(20分程度以上)かかってHEATNBの効果はほぼ一定のレベルに到達した(図II-5)。HEATNBは正味の電荷を持っておらず、TNBSに比べ疎水性が高いので、より膜を通り易く、神経末端の内部でその効果を発揮しているかもしれない。しかし、HEATNBの効果は完全に可逆的なのでこの可能性は低い(図II-6)。さらに、HEATNBによるEPP振幅の増大が一定レベルに到達するまでの時間経過がTNBSを低い濃度で投与した時と似ていた。TNBSは電荷を持っており膜を透過しにくいことが予想されるため、このHEATNBとTNBSの効果の時間経過の類似性を考慮すると、HEATNBも膜を透過して末端内で効果を発揮しているとは考えにくい。また、刺激をするとシナプス前膜の小胞膜の回収(endocytosis)が促進されると考えられているが、結果の項で述べた通り、0.25 Hzで刺激してもHEATNBによる自発的な放出の頻度の増加効果がさらに増えることはなかった。つまり、HEATNBは膜の回収に伴ってシナプス小胞内に取り込まれて効果を発揮しているわけではないといえる。以上のことから、HEATNBはシナプス前膜の脂質二重層中に取り込まれ、刺激に同期した放出に重要であるシナプトタグミンのようなシナプス小胞の膜タンパクと相互作用しているようなシナプス前膜中の膜タンパク、例えばニューレキシン、シンタキシン(HPC-1)、などと可逆的に結合して効果を発揮していると思われる(図I-3参照)(for review see Südhof 1995)。

II-4-3. HEATNB がシナプスの短期可塑性の 4 つの成分に与える効果

式(II-3)で示したように、シナプスの短期可塑性のそれぞれの成分はかけ算の関係にある(Zebgel & Magleby 1982; Tanabe & Kijima 1989)。この式は、促通、増進、増強の伝達物質放出への寄与を示しているが、速い促通と遅い促通の関係はまだ良く解っていない。つまり、この式は、伝達物質の放出機構には促通、増進、増強に対応した、少なくとも3つの異なる過程が含まれていることを示している。それゆえ、4つの短期可塑性が同じ機構を通して起っているということは考えにくい(Tanabe & Kijima 1992)。今回私は、HEATNB が増進の大きさを著しく減少させることを示した。この結果を説明する一つの考え方として、HEATNB が増進を起こす基となる機構を活性化したことが考えられる。つまり、HEATNB 投与によりその機構はすでに活性化されており、連続刺激による放出増大の過程においてその機構はすぐに飽和してしまうことが予想され、増進の見かけの強度が減少するということが起ったと考えられるからである。

0.15 mM の HEATNB は増強の大きさを約 1.5 倍にまで増加させた。このことから、HEATNB は、増強を起こす機構を直接活性化することはできないが、神経刺激による活性化がされ易い状態にしていたことが考えられる。

以上まとめると、HEATNB のユニークなシナプス前末端への効果を研究・解明することは、化学シナプスにおける神経伝達物質の放出の機構を明らかにするうえで非常に有用なものであると言える。

§ III カエル神経筋接合部におけるシナプス前神経末端内の Ca^{2+} イメージング

III-1. 序

前述のように、神経の情報伝達においてシナプスが重要な役割を担っている事は事実である。しかし、シナプス前末端からの神経伝達物質の放出機構や、伝達の可塑性の機構については依然多くの点が不明のまま残されている。

また、序論の章でも述べたようにシナプス前末端内の遊離 Ca^{2+} イオンはシナプス前末端からの神経伝達物質放出機構や、シナプス伝達の可塑性に重要な役割を担っているのも明らかである。近年様々なシナプスにおいていくつかの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定がなされてきている(Delaney et al. 1991; Wu & Saggau 1994; Regehr et al. 1994; Delaney & Tank 1994; Kobayashi & Tachibana 1995)。いくつか紹介すると、モルモット(guinea pig)の海馬のシナプスで paired-pulse facilitation を起こした時のシナプス前神経末端の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の静止レベルへの減衰の時定数は数百ミリ秒であった(Wu & Saggau 1994)。ザリガニの神経筋接合部(Delaney & Tank 1994)やモルモット(guinea pig)の海馬のシナプスで(Regehr et al. 1994)、連続刺激をした場合は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰には数秒から数十秒を要した。しかし、シナプス前末端からの神経伝達物質の放出過程と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関係については今なお多くの議論がなされており、結論が得られていないままである。また、カ

ルシウムイオンのシナプス前末端内でのダイナミクスについても、その流入・排出・貯蔵の経路については解ってきているものの(図 I-4; Pietrobon et al. 1990; McMahon & Nicholls 1991)、実際のカルシウムイオンの動態については不明の点が多く残されたままである。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定 of 最も代表的な手法として、カルシウム感受性蛍光指示薬の蛍光強度を蛍光顕微鏡に取りつけた高感度カメラや光電子増倍管などで測定する手法がある。最近では、異なる2波長の蛍光強度の比を測定する事でカルシウム濃度の絶対値を定量することができる蛍光指示薬(Indo-1、Fura-2 など)が開発、改良され(Grynkiewicz et al. 1985)、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定もいろいろな系で行われるようになってきた。これらの試薬のうち Indo-1 は 図 III-1 に示すように 350 nm 付近の波長で励起した場合 450 nm 付近の波長を境に、それより短い波長の蛍光は $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加と共に蛍光強度が増加し、長い波長の蛍光は $[\text{Ca}^{2+}]$ の増加と共に蛍光強度が減少する。この特徴を利用して、それら2つの波長の蛍光強度の比をとることにより、蛍光色素の量に関係のない $[\text{Ca}^{2+}]$ の絶対値を測定することが可能である。また、レーザー共焦点顕微鏡という高空間分解能の光学顕微鏡の生物試料への適用により、非常に高い空間分解能での蛍光測定が可能になってきた(Kuba et al. 1994)。

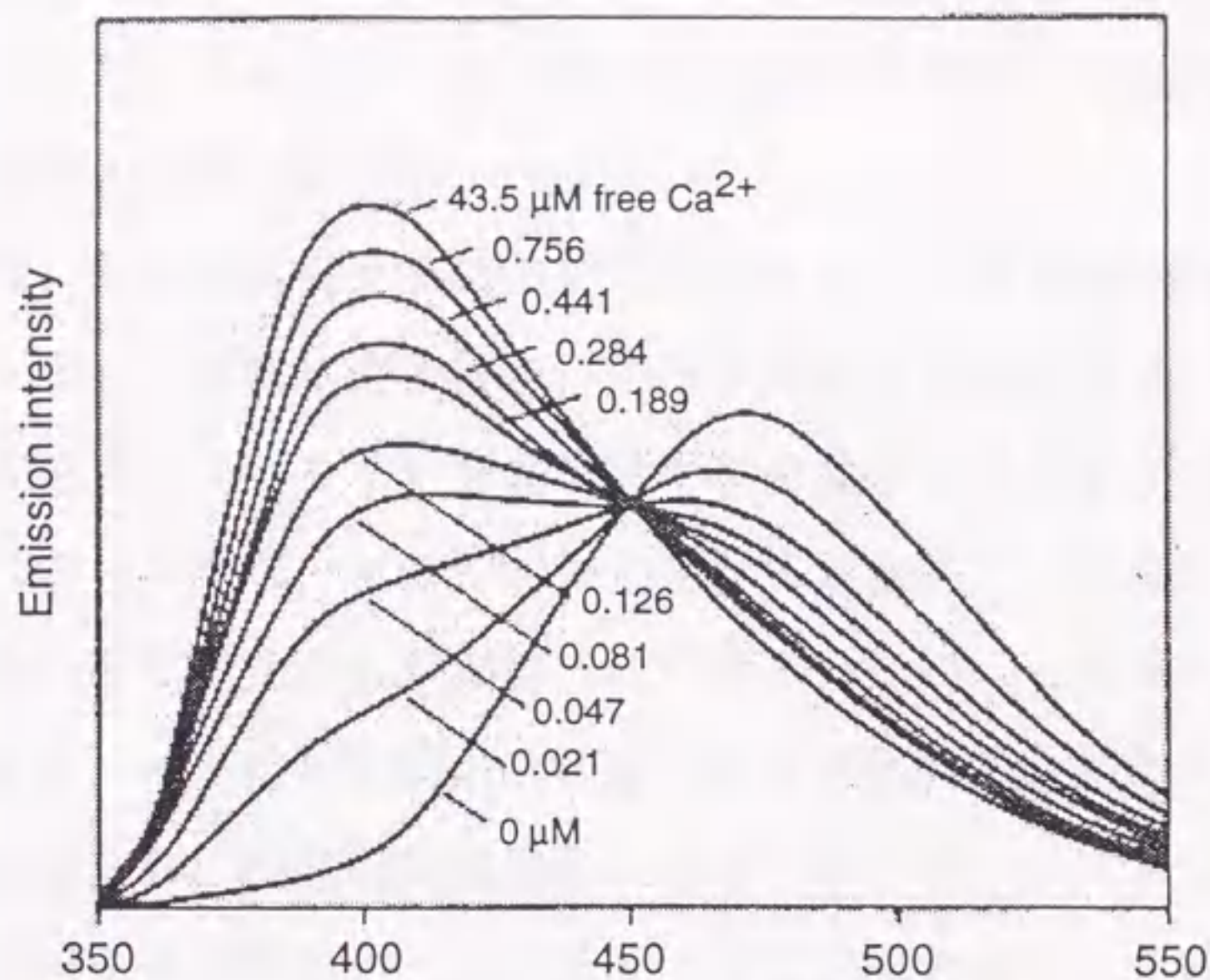


図 III-1 355 nm で励起した場合の Indo-1 の蛍光スペクトルの遊離 $[Ca^{2+}]$ による変化(Haugland 1992)。

カエルの神経筋接合部はシナプスのモデル系として多くの研究がなされてきた。しかし、未だにただ一つの例(Robitaille & Charlton 1992)を除いて、カエルの $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した例はなく、生理学的、薬理的な手法(Dodge & Rahamimoff 1967; Zengel & Magleby 1981; Tanabe & Kijima 1992; Zengel et al. 1994)あるいはそれらの結果をもとにしたシミュレーション(Simon & Llinás 1985; Fogelson & Zucker 1985; Nowycky & Pinter 1993)などから $[Ca^{2+}]_i$ 変化を推定しているのみである。Robitaille & Charlton (1992)も $[Ca^{2+}]_i$ が連続神経刺激によって上昇することを確認ただけで、 $[Ca^{2+}]_i$ を定量するには至っていない。

カルシウム感受性蛍光指示薬は、一般に、カルシウムイオンと配位結

合するため、マイナスの電荷を持っており、細胞膜を通過することができない。しかし、カルシウム指示薬を細胞内に負荷する方法にはいくつかある(Diliberto et al. 1994; Kao 1994)。

第一には、マイナス電荷を持つ基をアセトキシメチル化(AM-化)した膜透過性のカルシウム指示薬を細胞外から負荷する方法がある。この方法は細胞を侵襲することなく、簡便に指示薬を負荷することができる反面、細胞外のエステラーゼなどによって分解され易く、細胞外の結合組織などが多い系では指示薬が細胞内に負荷されない、という欠点を持っている。また、AM-化した試薬は細胞内に入ると、細胞内のエステラーゼにより分解され、細胞膜非透過性になるとともに、カルシウム指示薬としての機能を発揮するが、エステラーゼにより分解される前に細胞内のオルガネラなどに取り込まれてしまう可能性がある。この方法は、中枢の培養系などでは良く用いられるが、カエルの神経筋接合部のシナプス前末端にはこの方法で負荷するのは難しい(但し、カルシウム指示薬 fluo-3 や、前章に述べたようにカルシウムキレート剤 BAPTA などはこの方法で負荷可能である(Robitaille & Charlton 1992; Tanabe & Kijima 1992))。

第2の方法としてカルシウム指示薬を細胞刺入した微小電極からイオン泳動的にあるいは圧力を用いるなどして細胞内に直接注入するという方法がある。この方法は最も確実な方法といえるが、脊椎動物の神経軸索は細い上に神経繊維のまわりにミエリン鞘と呼ばれる鞘があり電極などを直接刺す事は困難である。また、ミエリン鞘を被っていないシナプスの領域は非常に小さいので、そこに直接注入する事も不可能に近いので、カエルの神経筋接合部シナプスではこの方法は使えない。

第3の方法として、軸索輸送による方法がある。この方法は、神経軸索の能動的輸送、受動的輸送(拡散)、を用いて神経軸索の断片からカルシウ

ム指示薬の輸送をさせるという方法である(Popov & Poo 1992; Fritzschi 1993; Peng & Zucker 1993; Yawo & Momiyama 1993)。この方法は無侵襲であるが、カルシウム指示薬を始めとする様々な蛍光試薬に対する輸送速度は大変遅い(~ 2 mm / hour)(Fritzschi 1993; Peng & Zucker 1993)ため、色素を細胞内に負荷するのに非常に長い時間がかかる事が予想される。また、軸索輸送をさせるための最適な条件も全く分からなかった。そのため、今まで、この方法でカエルの神経筋接合部シナプスにカルシウム指示薬の負荷に成功した例はなかった。

このように、カエルの神経末端での $[Ca^{2+}]_i$ 測定の困難さの一つはカルシウム指示薬の細胞内負荷の困難さによるものであった。私は本研究において、カルシウム指示薬である Indo-1 を、軸索輸送により、シナプス前神経末端に負荷することに世界で初めて成功した。さらに、レーザー共焦点顕微鏡と水浸の対物レンズを用いて、直径が約 1~2 μm と非常に細かいカエル神経筋シナプス前末端の高い空間分解能での $[Ca^{2+}]_i$ 測定を行った。

III-2. 実験方法

III-2-1. Indo-1 の軸索輸送によるシナプス前末端への負荷

トノサマガエル(*Rana nigromaculata*)の皮膚胸筋(cutaneous pectoris muscle)の神経筋標本を用いて実験を行った。神経筋標本をカエルから取り出し、ガラスシャーレにシルガード(Silpot, Dow Corning)を敷いた、Indo-1 負荷用のチャンバーに装着した。神経軸索の断端を井戸型の窪みに挿入し、その井戸型の窪みに、Indo-1-K 30 mM を溶かした溶液(Indo-1-K 30 mM, HEPES-Na 10mM, pH 7.4)を 1 μ l 入れてそこに軸索の断端を浸けた。その井戸型の窪みとチャンバーの本体とはワセリンとカバーガラスを用いて分離し、神経筋標本のまわりは正常リンガー液(後述)で満たした。このチャンバーを恒温器に入れ、21°C で12~24時間インキュベートし、Indo-1 を軸索輸送によりシナプス前末端に負荷した。

III-2-2. 電気生理的手法

Indo-1 を負荷した神経筋標本は、刺激電極(Pt)の付いたプラスチックセルに固定され、そのセルは顕微鏡に固定した灌流用のチャンバー上に置かれた。灌流したリンガー液の組成は、以下の通りである。

正常リンガー液:

113 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 1.76 mM CaCl₂, 2.3mM NaHCO₃, 5mM glucose

Ca²⁺ × 5 リンガー液:

104 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 8.8 mM CaCl₂, 0.47 mM NaHCO₃, 5 mM glucose
Ca²⁺ 1.0 mM リンガー液、Ca²⁺ 0.5 mM リンガー液、無 Ca²⁺ リンガー液は、
正常リンガー液の CaCl₂ を 1.0 mM、0.5 mM、0.0 mM にし、MgCl₂ を 5.3
mM 加えたもので、全体のイオン強度が同じになるように NaCl で調節し
た。また、神経刺激により筋収縮が起るのを避けるため、ニコチン様アセチ
ルコリンレセプターの阻害剤である d-ツボクラリン 10 μg/ml を各リンガー
液に溶かして使用した。

III-2-3. 蛍光測定装置と蛍光測定の手法

蛍光測定は水浸の対物レンズ(Nikon, Fluor 40X water / N.A. 1.15)を取りつけ
たレーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡(BioRad MRC-500 + Nikon TMD-300)を用
いて行った(Kuba et al. 1994)(図 III-2)。前述のように、カルシウム指示薬には
Indo-1 を用いたが、その励起光にはアルゴンイオンレーザー($\lambda = 351 \text{ nm}$)を用
いた。Indo-1 の発する蛍光を波長が 395 nm 以上の光を通すロングパスフィ
ルタ(DM (395 nm, LP))に通し、さらにその蛍光を波長 445nm 以上の光が直進
するダイクロイックミラー(DM (445 nm, LP))で二つの光に分け、それぞれを
光電子増倍管(Photomul.-1, 2)に入射させた(今後その短波長側の蛍光強度を
 F_s 、長波長側の蛍光強度を F_l と呼ぶことにする)。

このレーザー共焦点顕微鏡は 768 × 512 画素の画像を 1 s / image で取り込
むことができる。また、高速測定のために画面上の任意の1本の走査線のみ
の走査(ライン走査)が可能であり、この場合 4 ms / 1 line で画像を取り込む事
が可能である。

得られた画像は BioRad 社製のプログラム(SOM 及び COMOS) を用いて、データとしてパーソナルコンピュータ(IBM AX 互換機)に取り込み、ワークステーション(Indy, Silicon Graphics 社)上の Noran 社製のソフトウェア(InterVision)を用いて解析した。

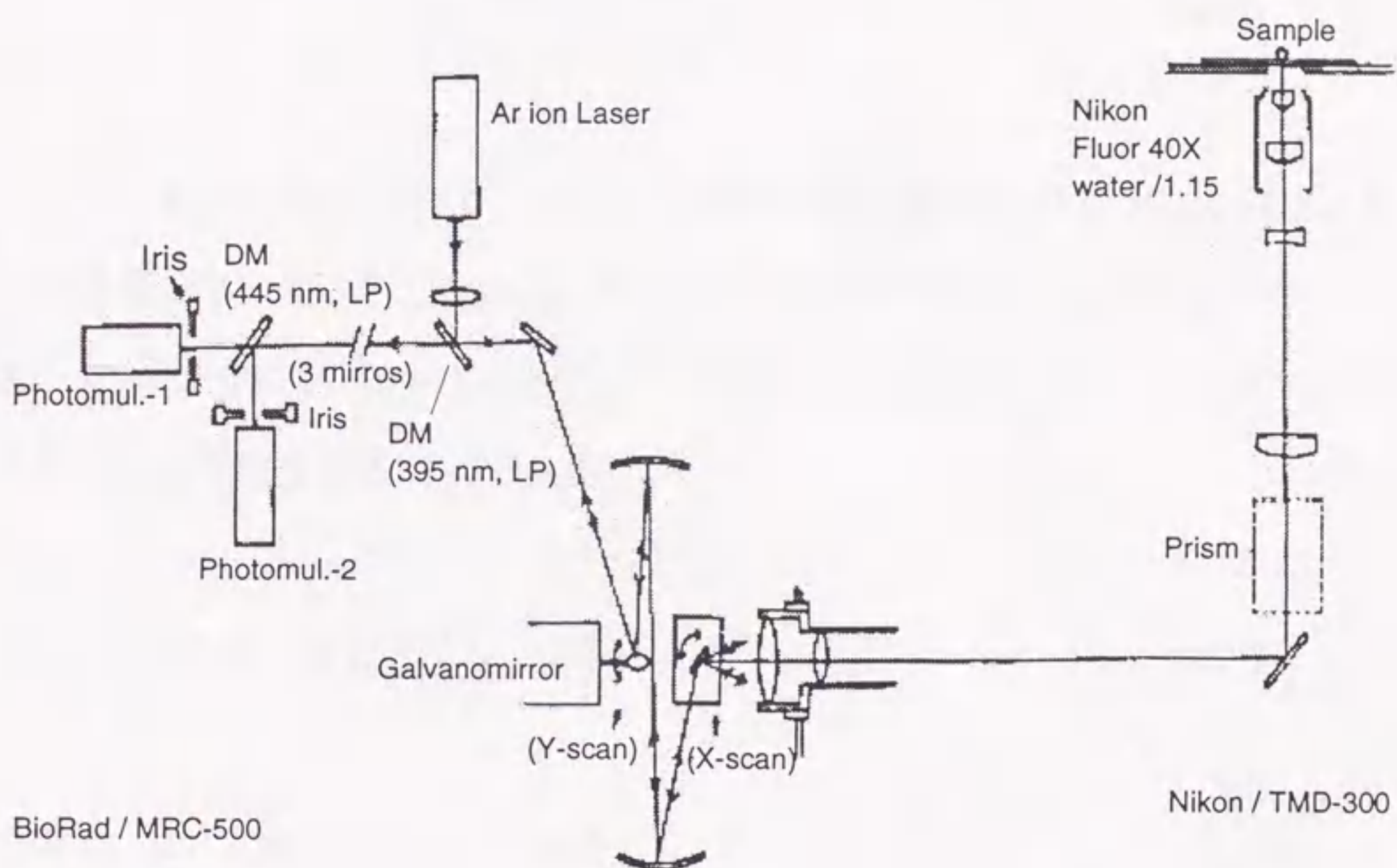


図 III-2 シナプス前神経末端内 $[Ca^{2+}]_i$ 測定に用いたレーザー走査型共焦点顕微鏡の概略図。アルゴンイオンレーザーからの光はダイクロイックミラー(DM (395 nm, LP))で反射され、ガルバノミラー(Galvanomirror)で x 方向、y 方向に走査され、顕微鏡(Nikon TMD-300)内に導入されて対物レンズ(Nikon, Fluor 40X water /1.15)を通して、試料(Sample)に到達する。試料からの蛍光は対物レンズを通り再び共焦点装置(BioRad / MRC-500)に戻り、波長が 395 nm 以上の光が DM (395 nm, LP) を通過し、DM (445 nm, LP)により、波長が 445 nm 以下の光が光電子倍增管 Photomul.-2 に入射し、445 nm 以上の光が Photomul.-1 に入射する。

III-2-4. 得られた蛍光強度から Ca^{2+} 濃度を求める方法

Indo-1 の蛍光強度から次のような式を用いて Ca^{2+} 濃度を算出する事が可能である (Grynkiewicz et al. 1985)。

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{S_{fl}}{S_{bl}} \right) \quad (III-1)$$

ここで、 K_d は Indo-1 の Ca^{2+} に対する解離定数、 $R = F_s / F_l$ 、 R_{max} は K_d より十分高い $[Ca^{2+}]$ での R 、 R_{min} は $[Ca^{2+}] = 0$ の時の R 、 S_{bl} は K_d より十分高い $[Ca^{2+}]$ での F_l 、 S_{fl} は $[Ca^{2+}] = 0$ の時の F_l である。また、この式は以下のように書き直す事が可能である。

$$[Ca^{2+}] = K_d' \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \quad (III-2)$$

ここで、 $K_d' = K_d (S_{fl} / S_{bl})$ である。

K_d' 、 R_{max} 、 R_{min} は遊離の Ca^{2+} 濃度 (0 - 100 μM) が分かっている擬似細胞内液 (KCl 110mM, MOPS-K 10mM, EGTA 10mM, pH 7.2) に Indo-1-K 10 μM を入れたものを用いて求めた (Kuba, *personal communication*)。Indo-1 や Fura-2 などのカルシウム指示薬の蛍光は細胞内のタンパクによって影響を受けるため、校正には、細胞内の糖代謝タンパクである aldolase (ald) を 5 mg / ml 入れた擬似細胞内液を用いた (Konishi et al. 1988)。その結果得られた値を表 1 に示す。

表1 較正により得られた K_d' 、 R_{max} 、 R_{min}

	+ald	-ald
K_d' (nM)	1550	749
R_{max}	2.41	1.98
R_{min}	0.934	0.528

+ald は aldolase 5 mg/ml を含む擬似細胞内液を用いて得られた値である。

-ald は aldolase を含まない擬似細胞内液から得られた値である。

Grynkiewicz et al. (1985) によると、115 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM K-MOPS (pH 7.05), 1 mM free Mg^{2+} , 37 °C の条件下で、Indo-1 の Ca^{2+} に対する K_d は 250 nM であったと報告されている。しかし、Indo-1 と類似した構造を持つ Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 Fura-2 の場合、タンパク質存在下では K_d の値が変わることが報告されているので (Konishi et al. 1988)、Indo-1 も同様に細胞中での K_d はここで示した値とは異なると考えられる。

III-2-5. 試薬

Indo-1-K、HEPES、MOPS、EGTA は同仁化学研究所から、aldolase は Boehringer Mannheim から、d-ツボクラリンは Sigma から購入した。他の薬品は和光の試薬特級を用いた。

III-3. 結果

III-3-1. Indo-1 によって染色したカエル神経筋接合部のシナプス前末端

図 III-3 に軸索輸送法で Indo-1-K を負荷して染色したカエル神経筋接合部のシナプス前末端を示す。この写真からも明らかのように、実験方法の項で述べたような負荷方法で、カエルの神経筋接合部シナプス前末端の可視化が可能であった。またこの図から、カエルの神経筋接合部は、長さが数十 μm から数百 μm で、幅が 1~3 μm のひも状、あるいは、網目状になっているという事が解る。このように染色されたシナプスにおいて神経軸索に電気刺激によりインパルスが発生させ、流入した Ca^{2+} による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加及び刺激後の減衰過程を様々な条件で観察した。

III-3-2. 50 Hz 500 回の刺激を行った時のシナプス前末端全体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化

図 III-4 に様々な $[\text{Ca}^{2+}]_e$ で、50 Hz で 500 回刺激を行った時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を示す。この図から、リンガー液中に Ca^{2+} がない場合を除いて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激により上昇し、刺激終了と共に減少していることが解る。また、無カルシウムリンガー液を用いた測定(図 III-4 D)では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が見られないことから、ここで上昇している $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は神経刺激により細胞外から流入したものである、という事が解った。さらに、図 III-4 A, B から、シナプス前

神経末端の部位は刺激と共に顕著に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しているが、神経軸索と思われる部位ではほとんど $[Ca^{2+}]_i$ は変化していない、ということが解る。このことは、神経刺激によって Ca^{2+} が流入する部位が神経末端部に極在していることを示唆している。

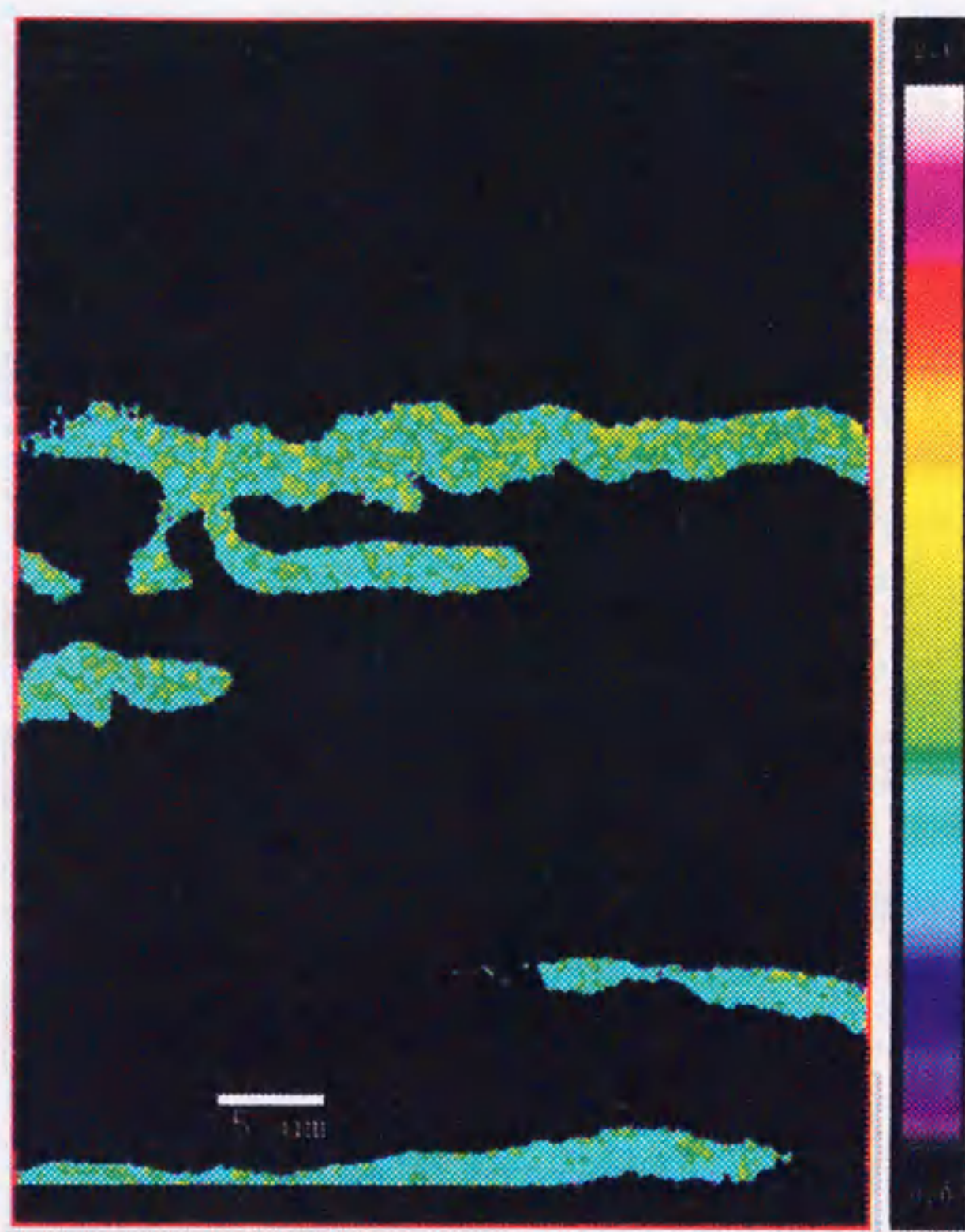
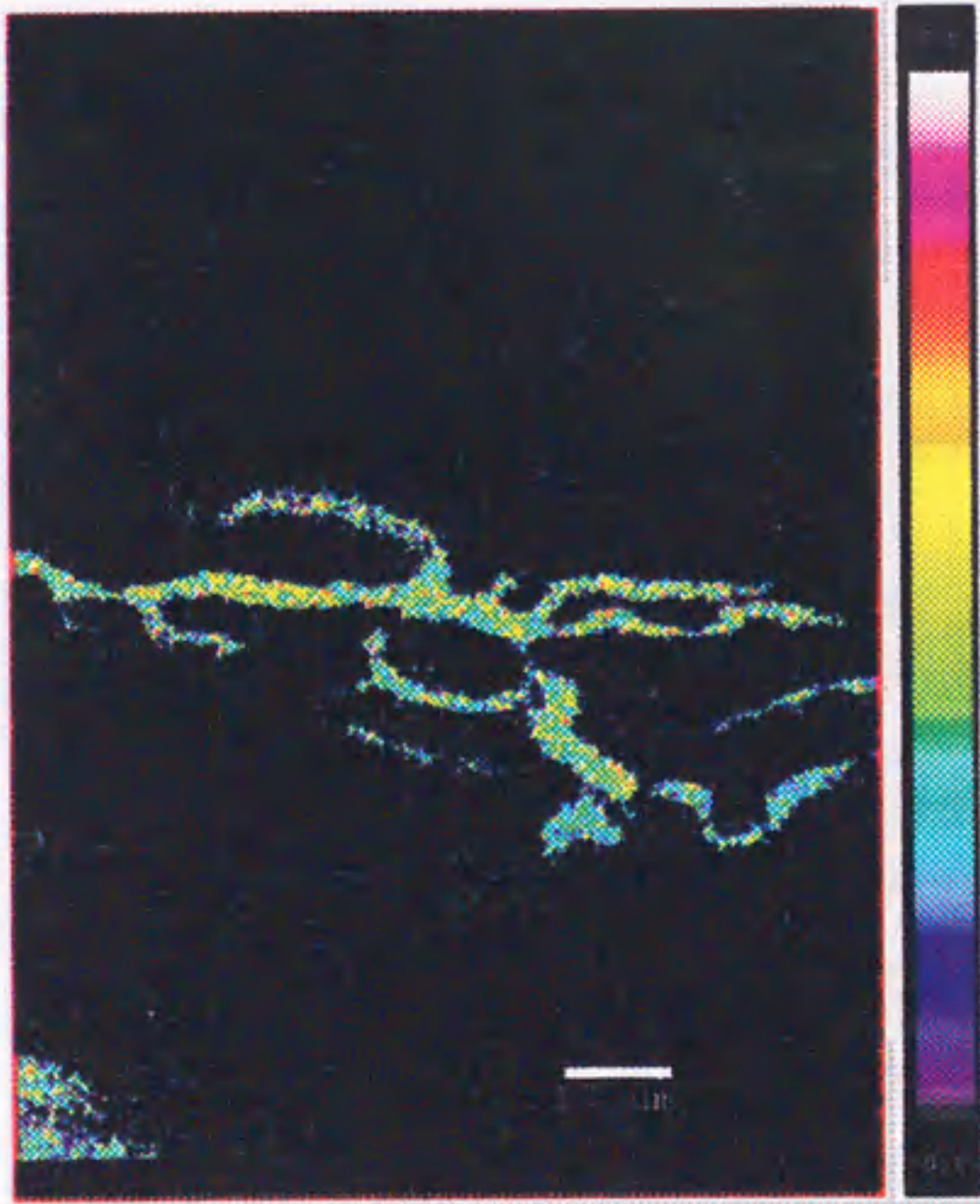
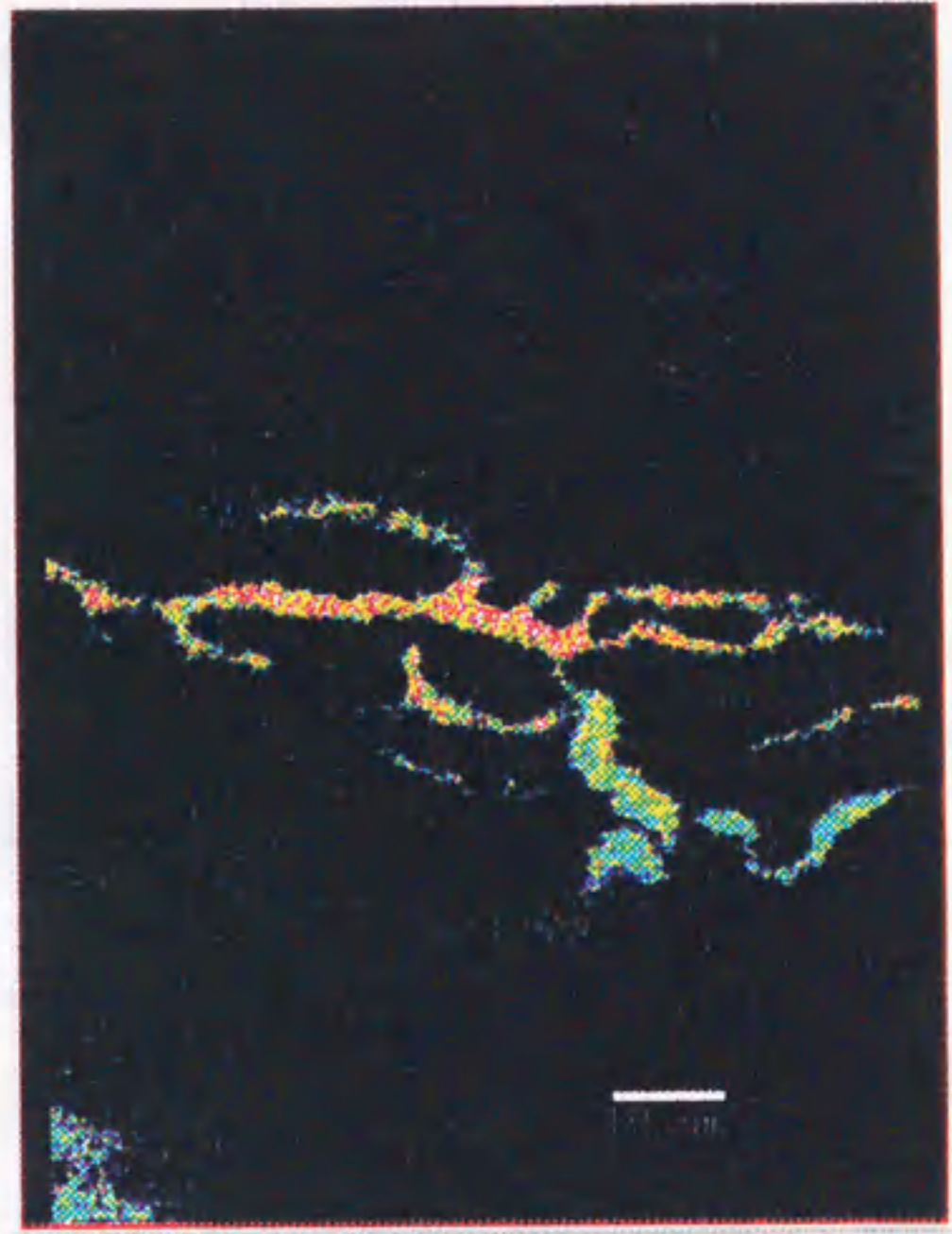


図 III-3 Indo-1-K を軸索輸送法で負荷して染色したカエル神経筋接合部のシナプス前末端のレシオ蛍光像 (F_s/F_f)。右に伸びるひも状のものが静止状態のシナプス前神経末端である。スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ 、カラーバーは $R(F_s/F_f) = 0 \sim 2.6$ である。

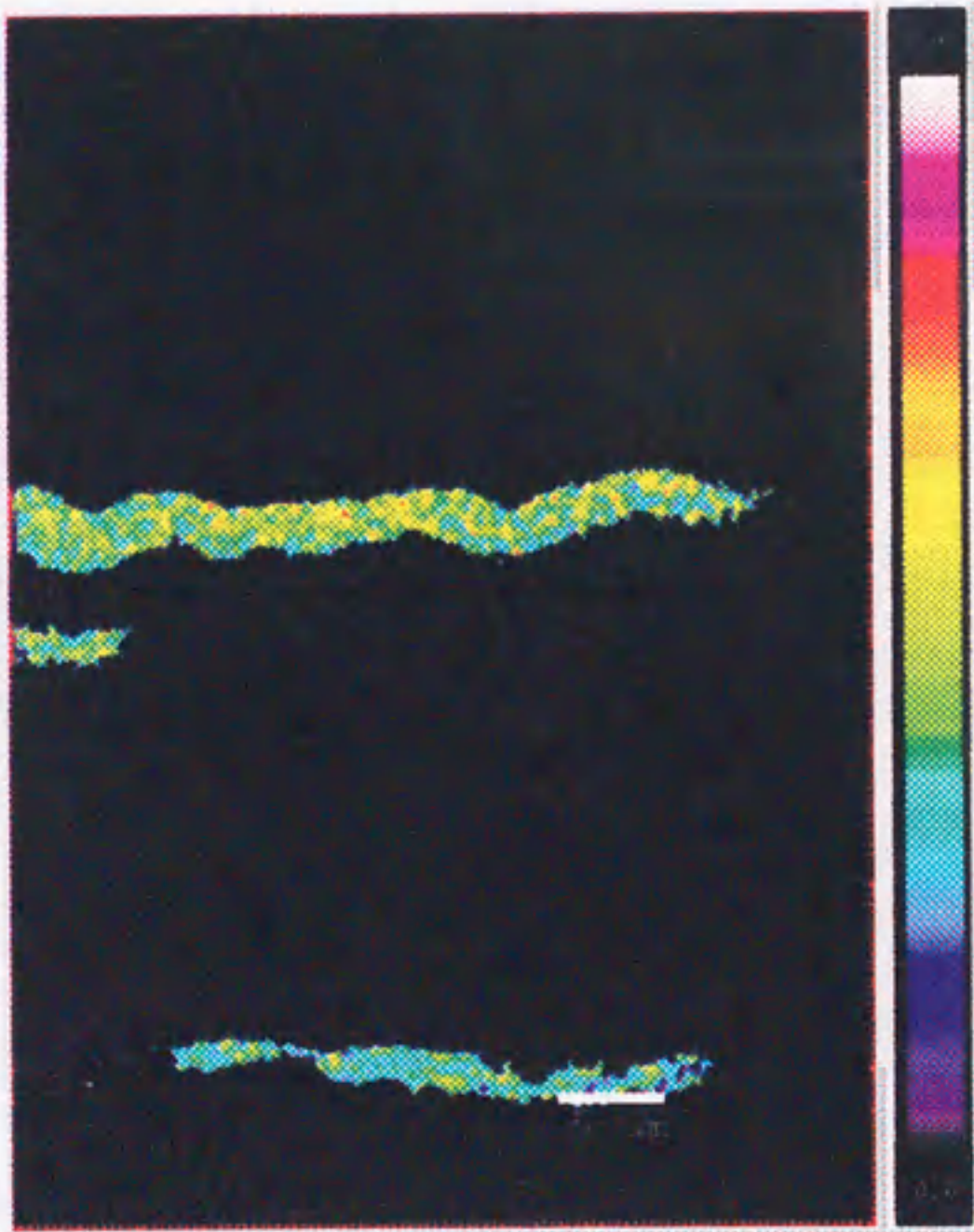
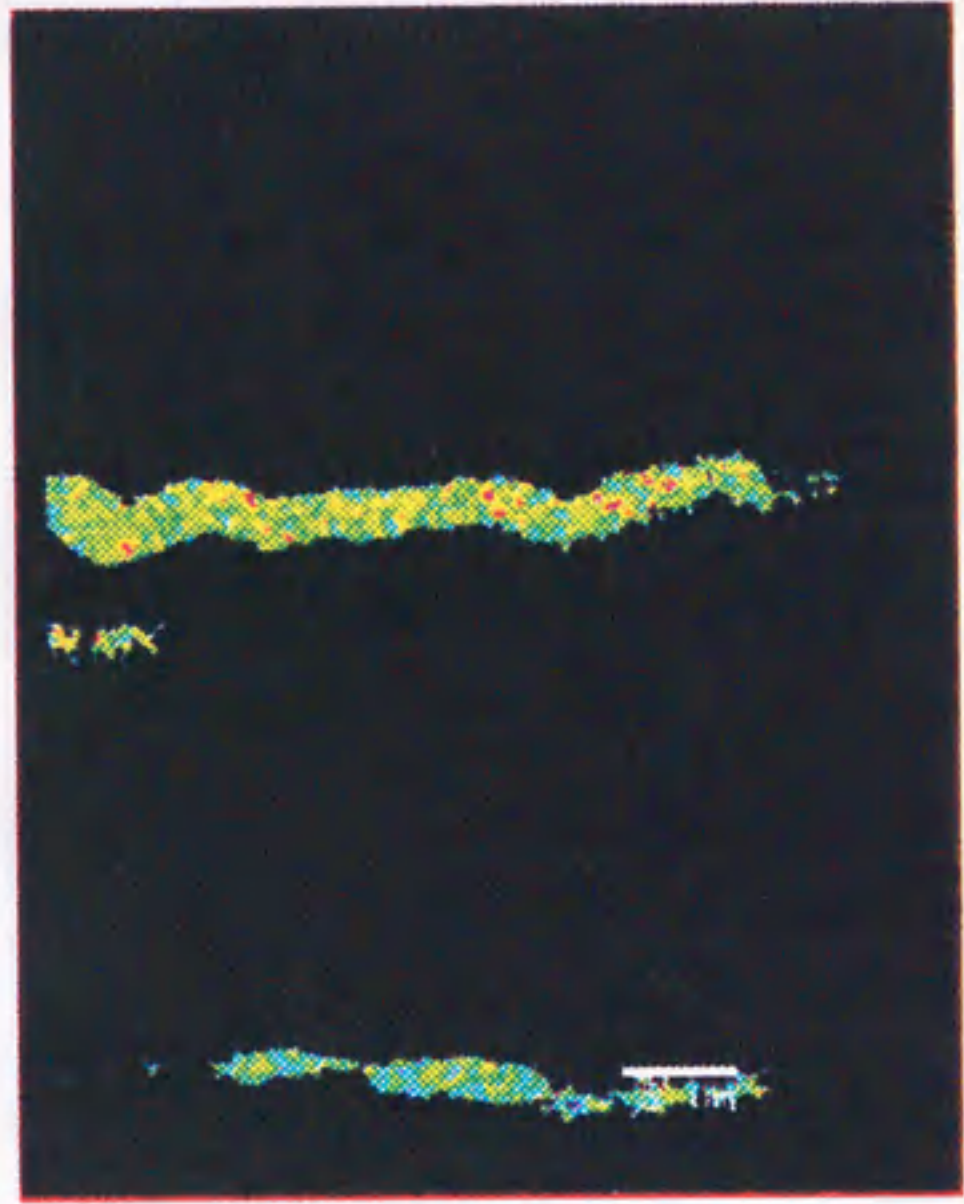
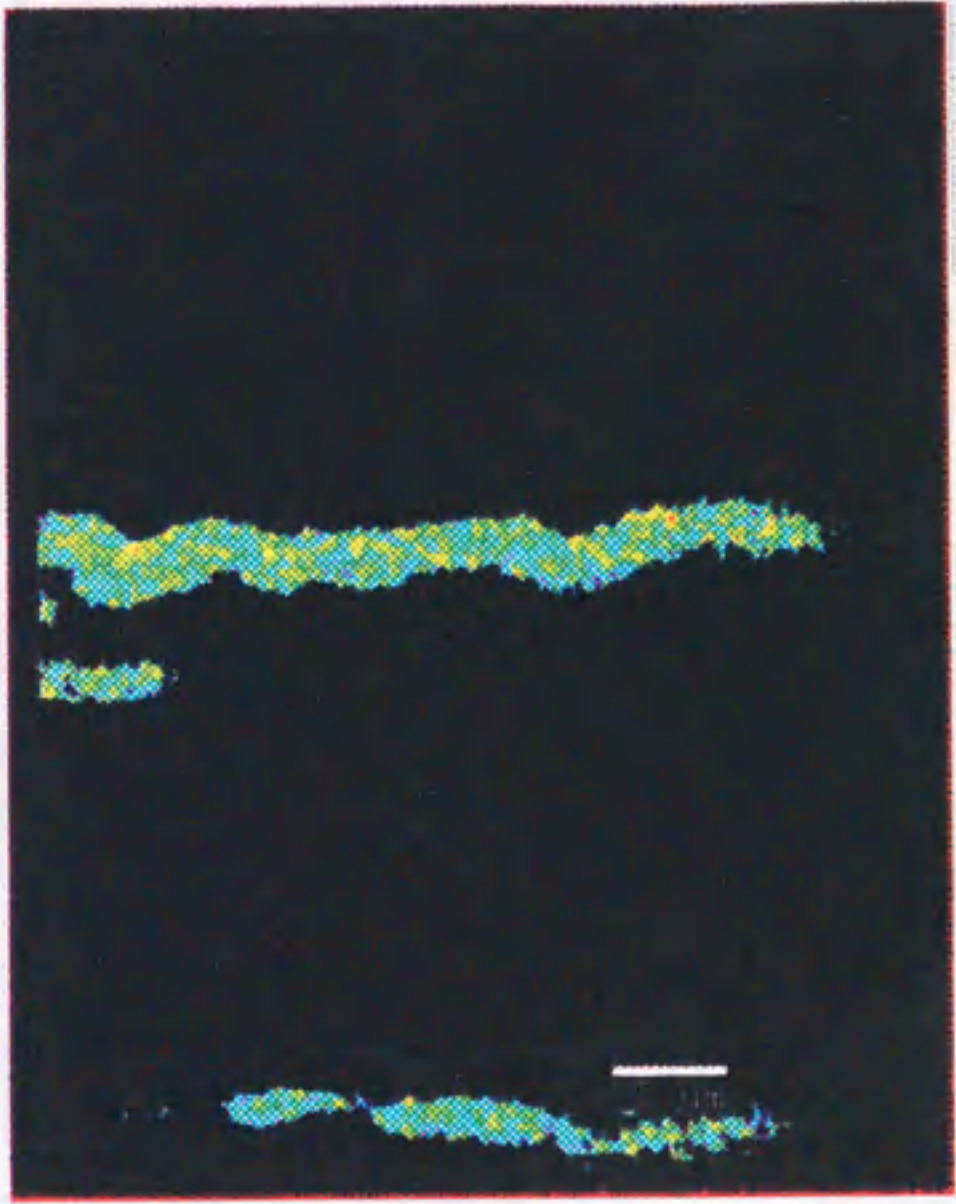
A



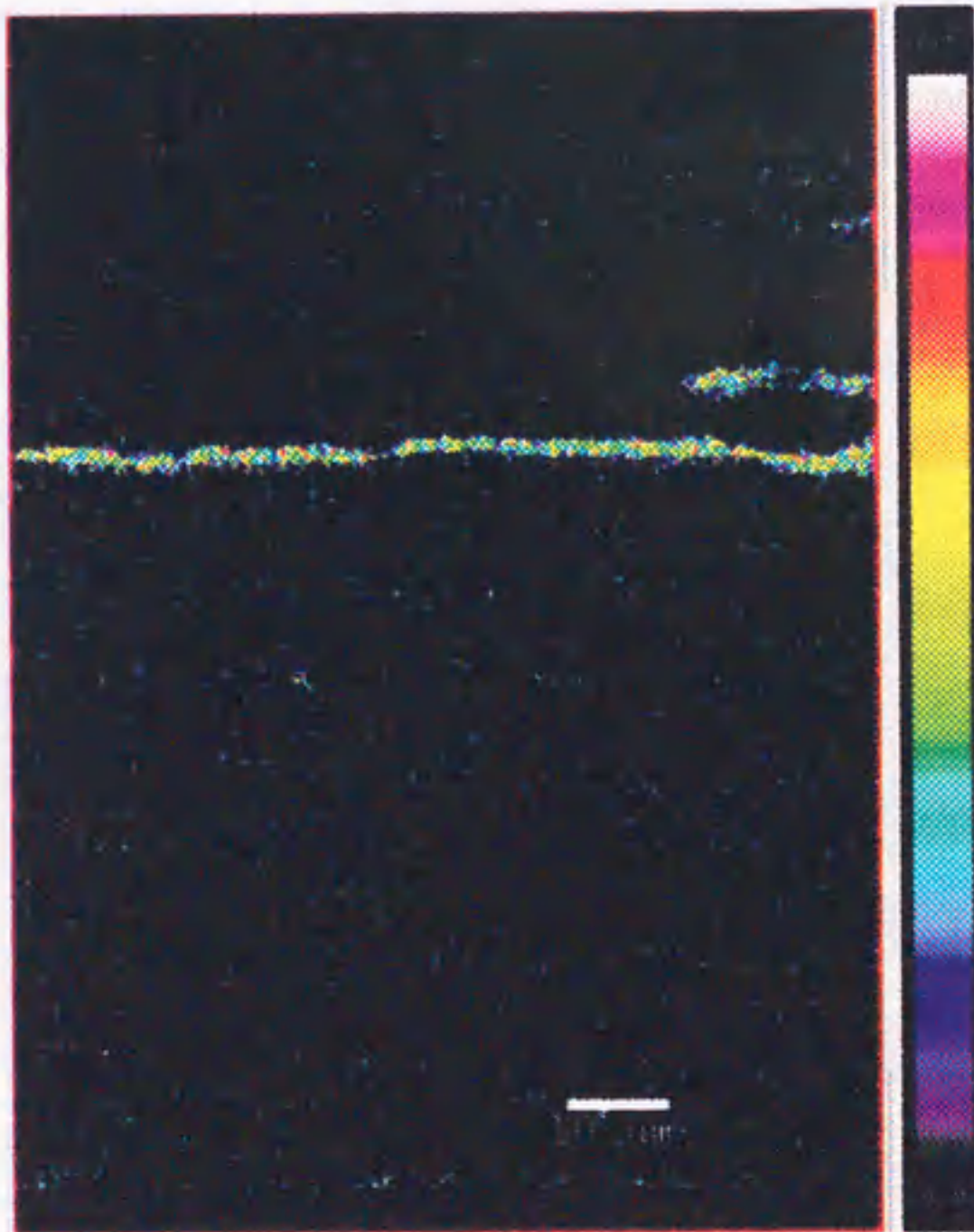
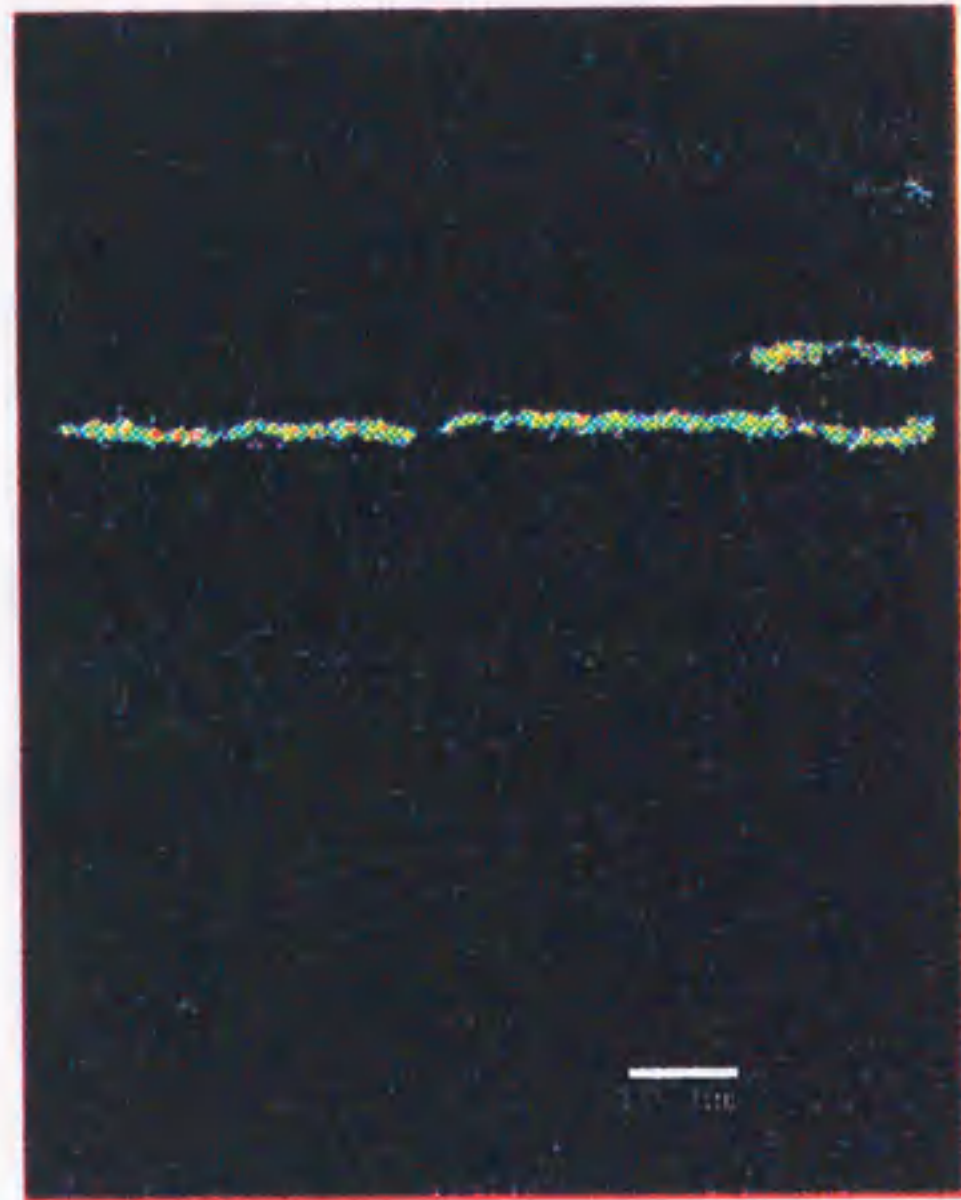
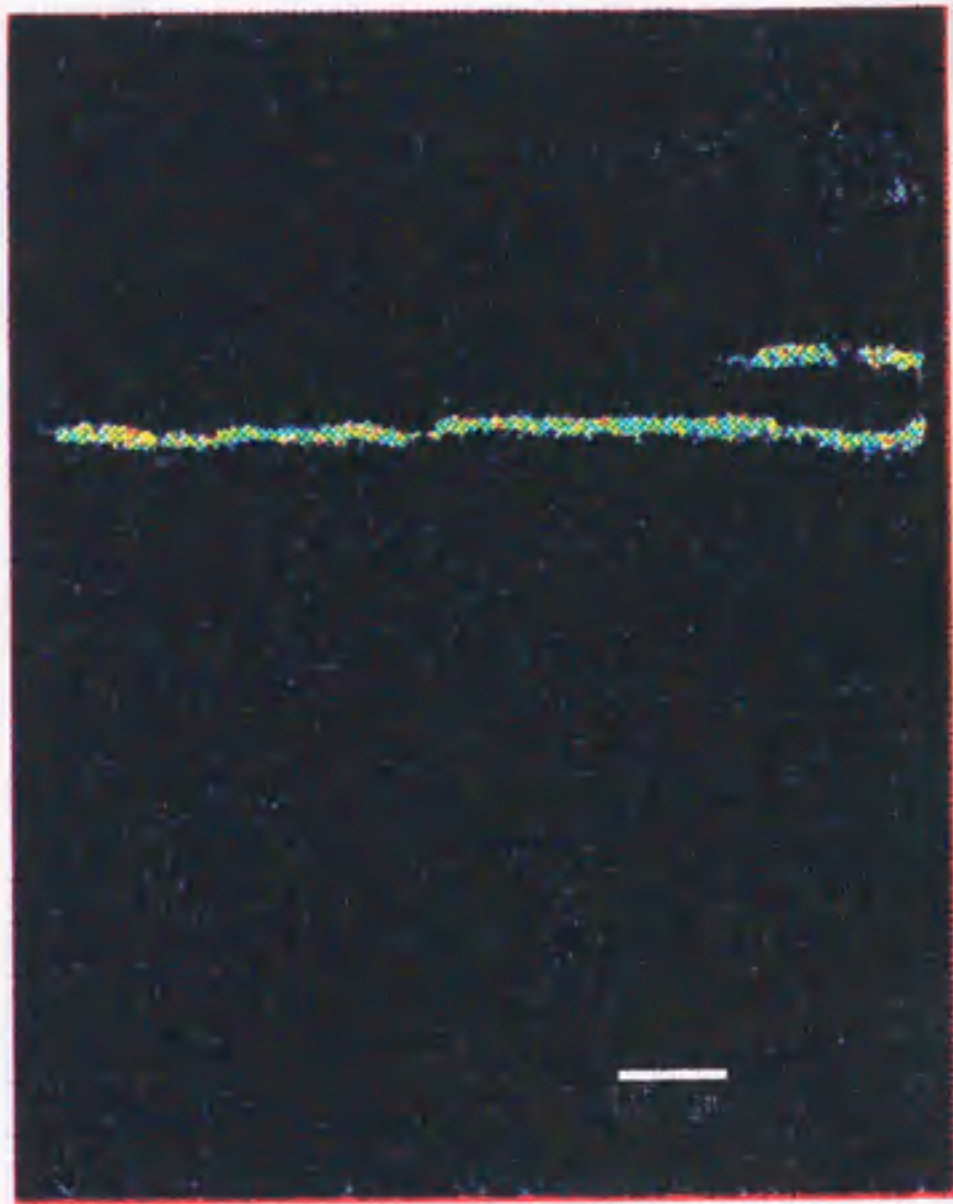
B



C



D



図III-4 様々なリンガー液中で 50 Hz 500 回刺激を行う前後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示す。A、B、C、D の順に $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液、正常リンガー液、 $Ca^{2+} 0.5 \text{ mM}$ リンガー液、無 Ca^{2+} リンガー液中での刺激前(各図において左上)、刺激開始6秒後から刺激終了まで(右上)、刺激後6秒後から10秒後(左下)のレシオ(F_s / F_i)イメージを示している。どの画像も 1 image / s でスキャンされた画像を 4 枚加算して得られた画像である。スケールバーは C 以外は $10 \mu\text{m}$ 、C は $5 \mu\text{m}$ 、カラーバーは $R = 0 \sim 2.6$ である。D 以外はどの図でも、刺激中の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ の静止レベルへの回復が見られる。

III-3-3. 様々な神経刺激パターンと様々な $[Ca^{2+}]_e$ での $[Ca^{2+}]_i$ の変化

ここでは、ライン走査 mode で連続刺激前後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化の時間経過を測定した結果を示す。連続刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ の減衰を次式のような1つの指数関数と2つの定数でフィットした。

$$[Ca^{2+}]_i(t) = Ca_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + [Ca^{2+}]_c + \Delta Ca^{2+} \quad (\text{III-3})$$

ここで、 $[Ca^{2+}]_i(t)$ は連続刺激終了後 t 時間経過した時の細胞内カルシウム濃度、 Ca_0 は連続刺激直後の $[Ca^{2+}]_i(t)$ の外挿値として求めたものであり、 τ は $[Ca^{2+}]_i(t)$ の減衰の時定数、 $[Ca^{2+}]_c$ は刺激前の静止状態の $[Ca^{2+}]_i$ (対照) の値、 ΔCa^{2+} は刺激後無限時間経過した時の $[Ca^{2+}]_i$ の外挿値と $[Ca^{2+}]_c$ との差である。 ΔCa^{2+} が本質的にどういう意味があるのかは議論の余地がある。

図 III-5 に正常リンガー液中で、100 Hz 100 回の刺激をした時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示す。この図から、 $[Ca^{2+}]_i$ は約 200 ms でほぼプラトーに達し、刺激終了後速やかに減少することが分かる。この減少を式 III-3 のように指数関数でフィットすると、減衰の時定数は 375 ms であった。Indo-1 と Ca^{2+} 結合部位の構造が全く同じで全体の構造も非常に似ている Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 Fura-2 の Ca^{2+} に対する解離速度定数は 96.7 s^{-1} であった(140 mM KCl, 20 °C, pH 7.4 – 8.4) (Kao & Tsien 1988)。Indo-1 もほぼ同様の解離速度定数を持つと思われるので、この程度の減衰の時定数の変化は、実際の細胞中での $[Ca^{2+}]_i$ の変化をほぼ正確に反映したものであると思われる。

さらに、高頻度の長く続く連続刺激にも関わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ が速やかにプラ

トーに達するという事は、 Ca^{2+} の細胞外への排出及び細胞内オルガネラへの取り込みが刺激中からかなり速いスピードで行われている事を示唆している。また、この図あるいは、この後に掲げる図を良く見ると、刺激中にも関わらず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は減少し始めているし、刺激終了後もフィットした曲線のまわりを振動的に減衰しているように見える。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の刺激中の減衰や振動がどういう意味を持つものかはここでははっきりしない。この解析ではひとつの指数関数でフィットしているのは減衰過程を大まかに記述する目安であってこれが正確であるかどうかについては議論の余地がある。このことは、後で議論する。

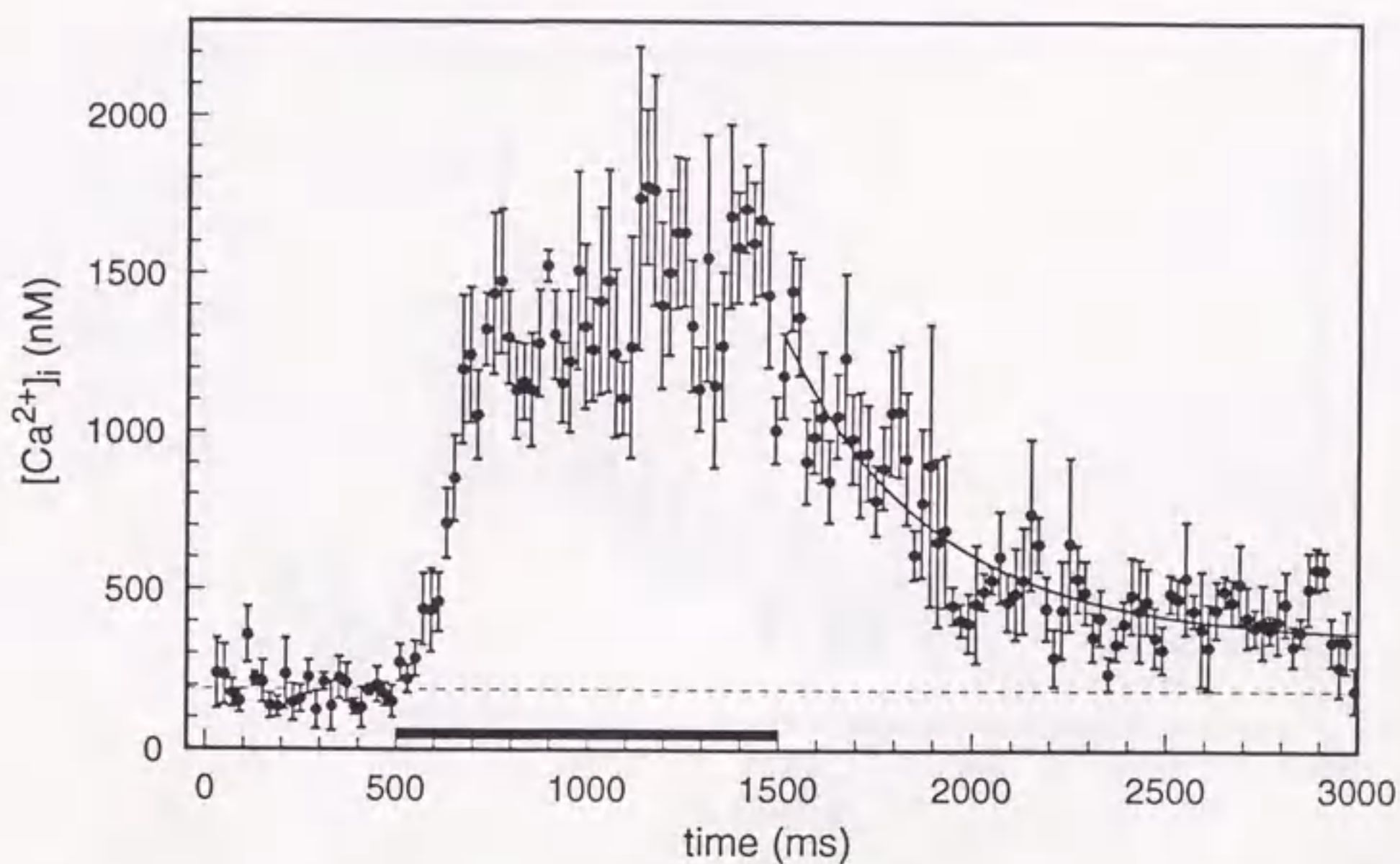
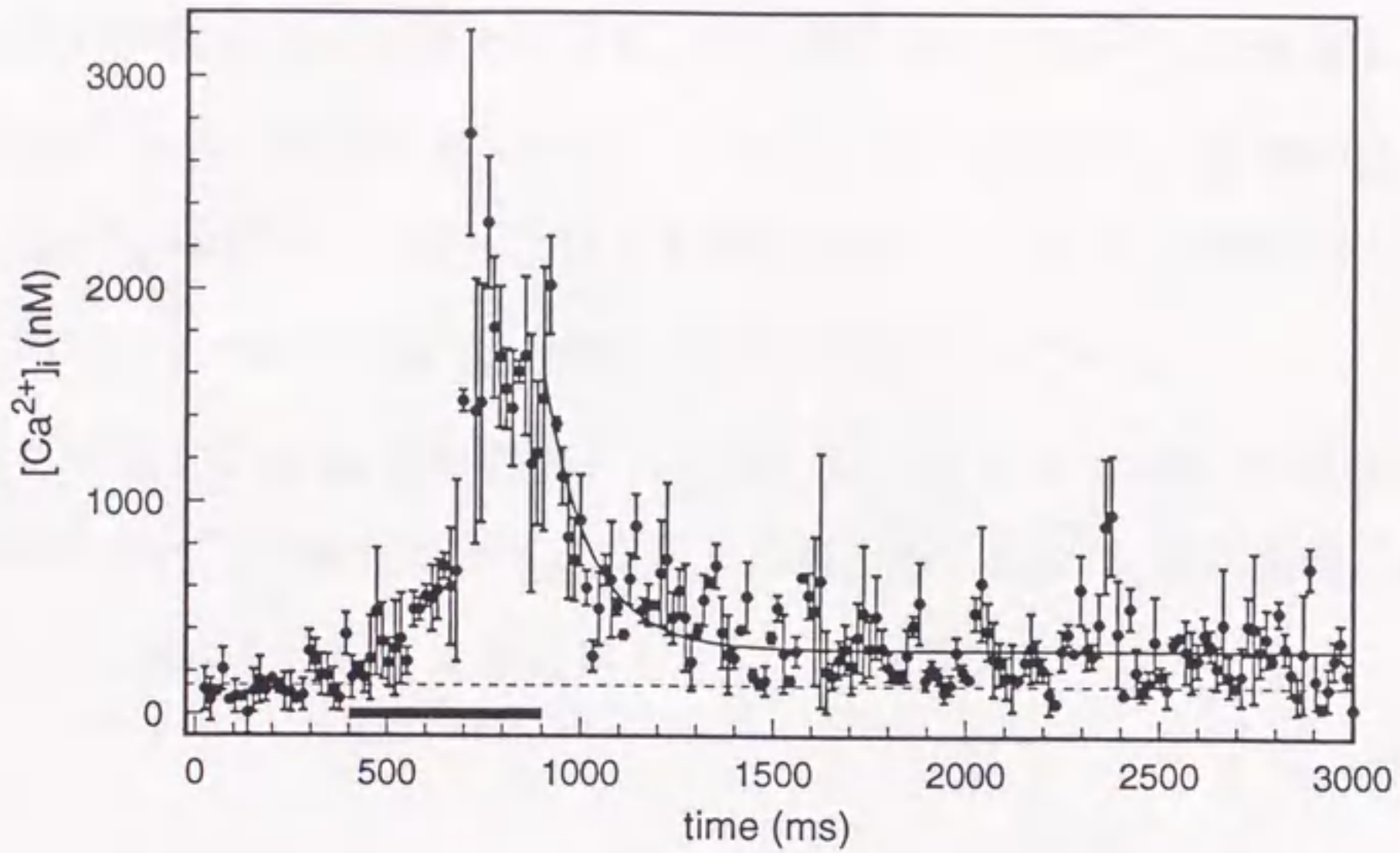


図 III-5 正常リンガー中で 100 Hz 100 回刺激した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化。同じシナプスから得られた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のデータの平均値(●)と S.E.M.(エラーバー)を示す。実線は最適の指数関数(eq. III-3)でそれぞれのパラメータは以下の通りである: $\text{Ca}_0 = 990 \text{ nM}$; $\tau = 380 \text{ ms}$; $\Delta\text{Ca}^{2+} = 160 \text{ nM}$ 。x 軸に平行な黒いバーは刺激を与えていた期間を示している。刺激前の対照の Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_c$)は 190 nM であった。

A



B

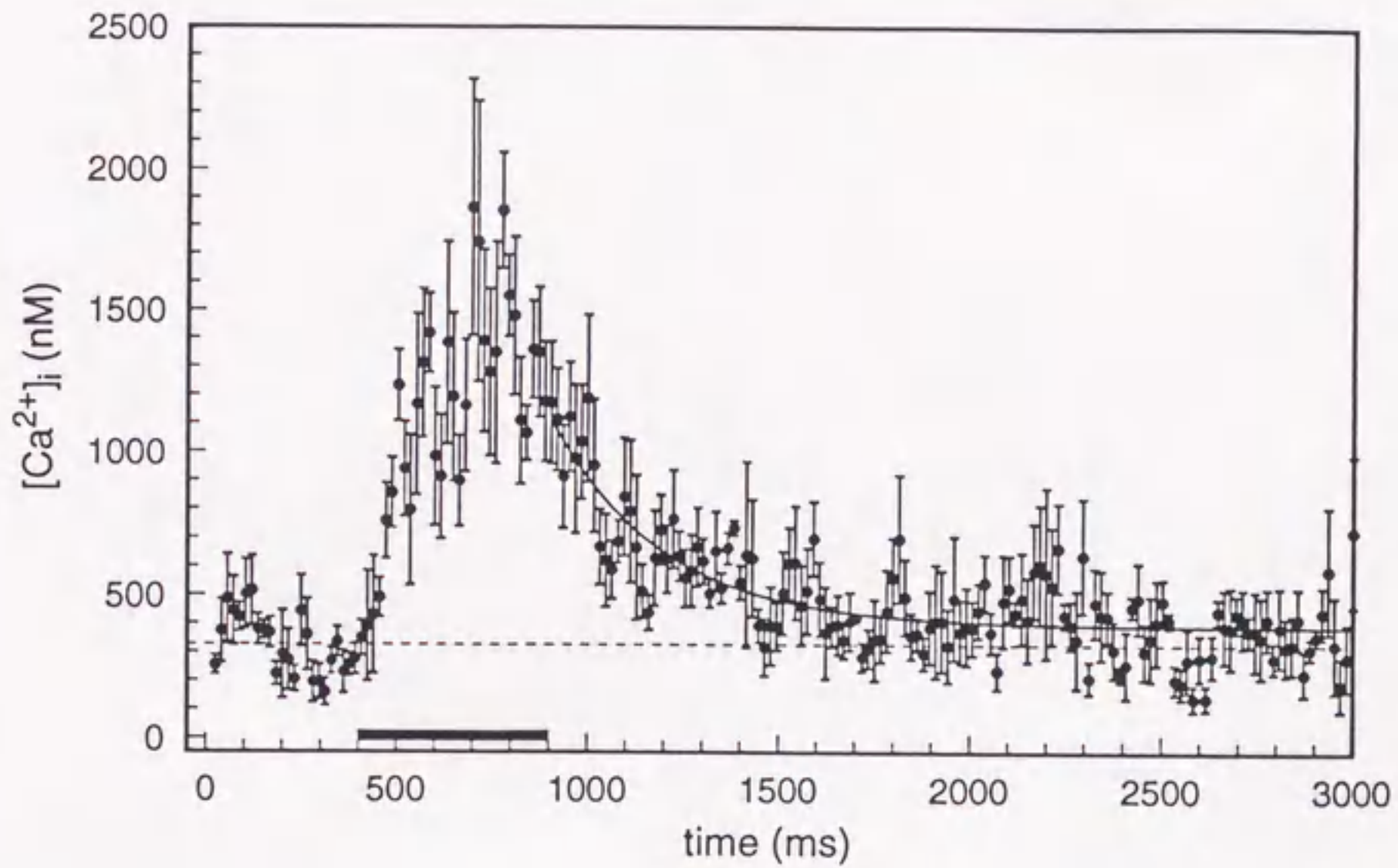
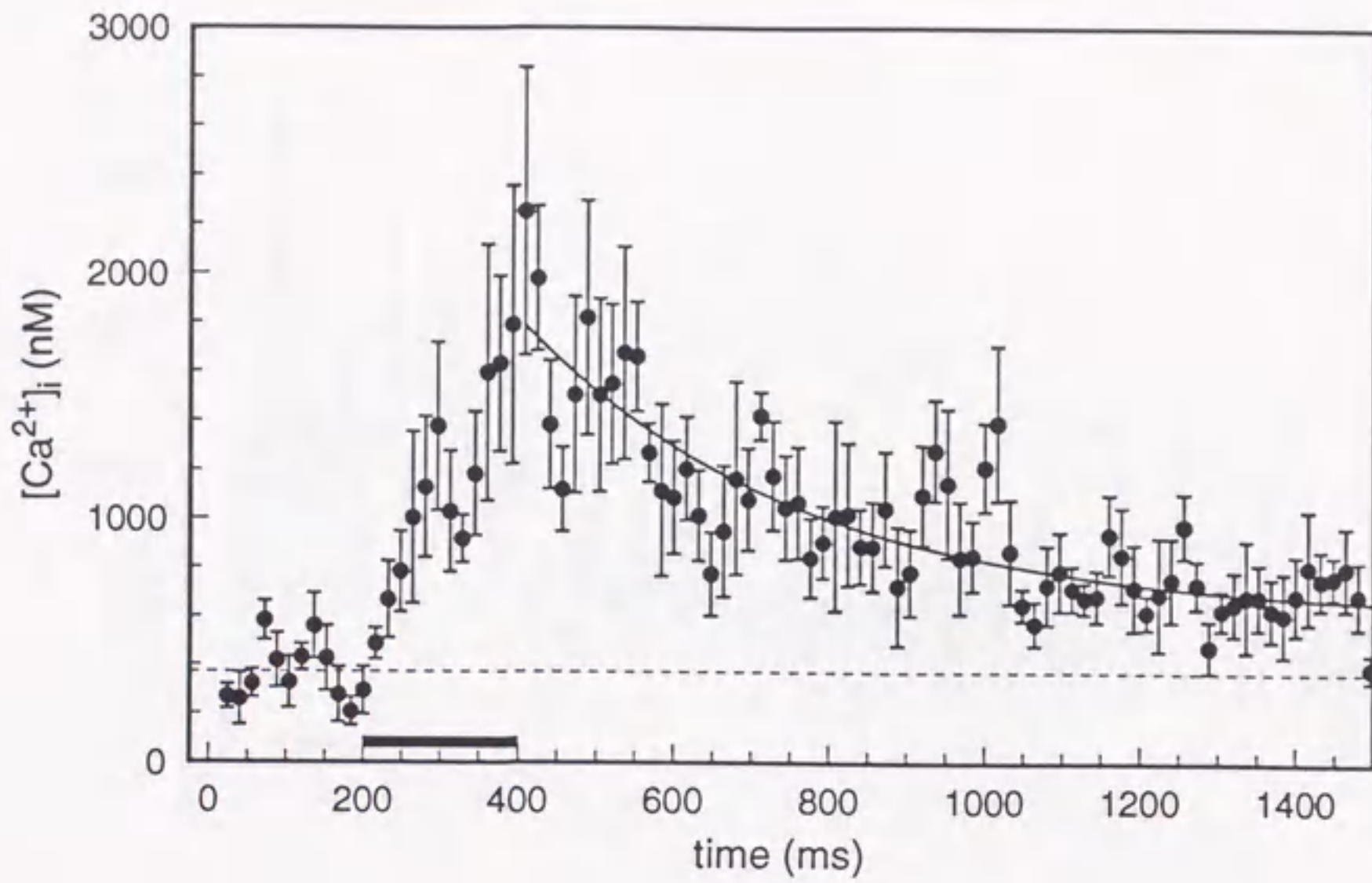


図 III-6 100 Hz で 50 回刺激した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化。A. $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液中での変化。最適指数関数から得られた値は以下の通りである: $Ca_0 = 1300$ nM; $\tau = 120$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 170$ nM。また、 $[Ca^{2+}]_c = 135$ nM であった。B. 正常リンガー中での $[Ca^{2+}]_i$ の変化。最適指数関数から得られた値は次の通りである: $Ca_0 = 730$ nM; $\tau = 290$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 65$ nM。 $[Ca^{2+}]_c = 326$ nM であった。

図 III-6 には $\text{Ca}^{2+} \times 5$ リンガー液中と正常リンガー液中で、100 Hz 50 回の刺激を行った時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を示す。この条件でも、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速に上昇し、刺激終了と共に急速に減少する。しかし、この場合でも、刺激中にも関わらず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はピークに達した後ある程度減少した。また、刺激中の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のピークの値は $[\text{Ca}^{2+}]_e$ が高い方が大きくなっていた。

図 III-7 には 100 Hz 20 回の刺激をした時、図 III-8 には 100 Hz 10 回の刺激をした時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を示す。これらの場合も、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激終了後、振動しながら減少していくように見える。

A



B

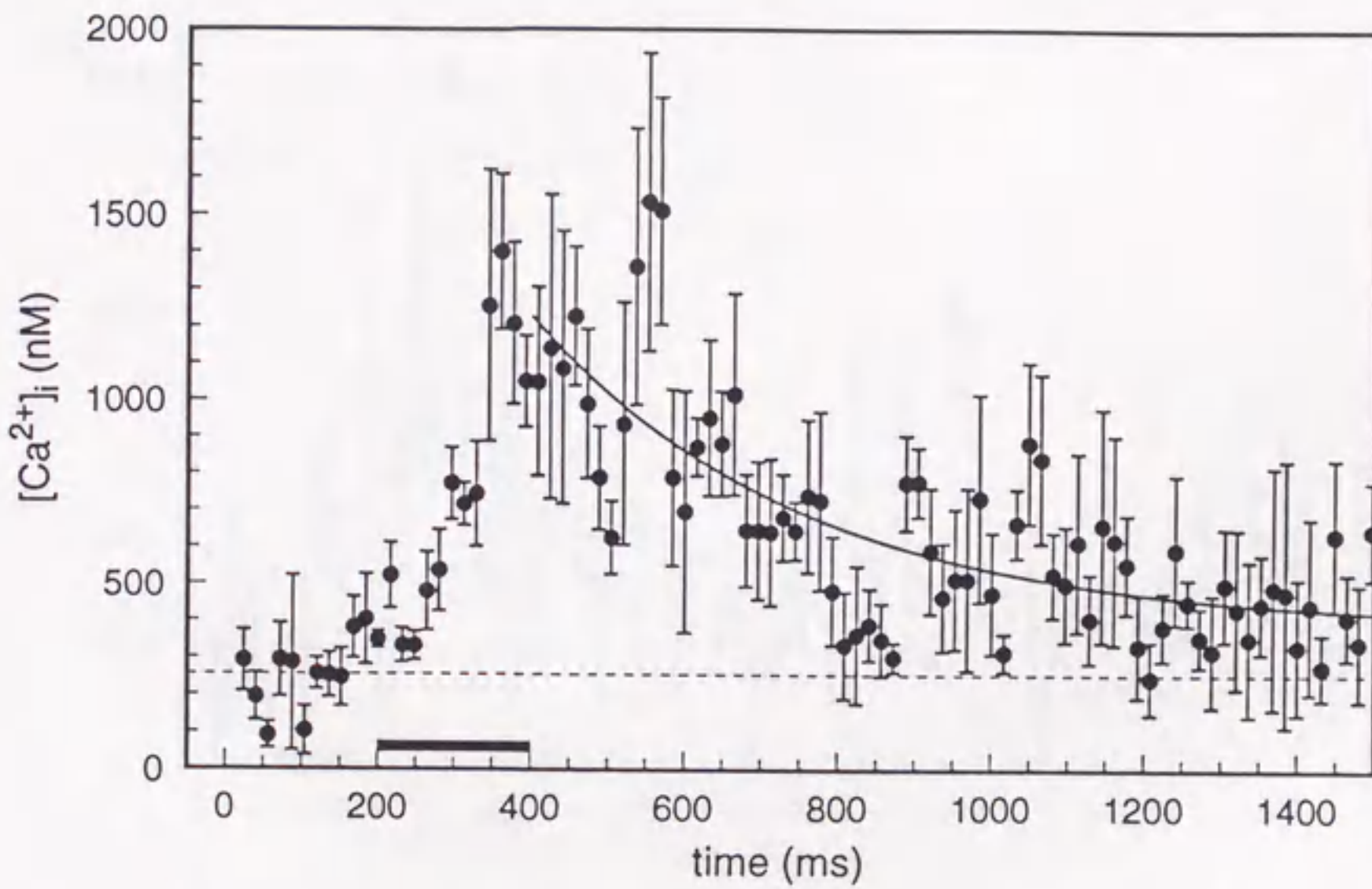
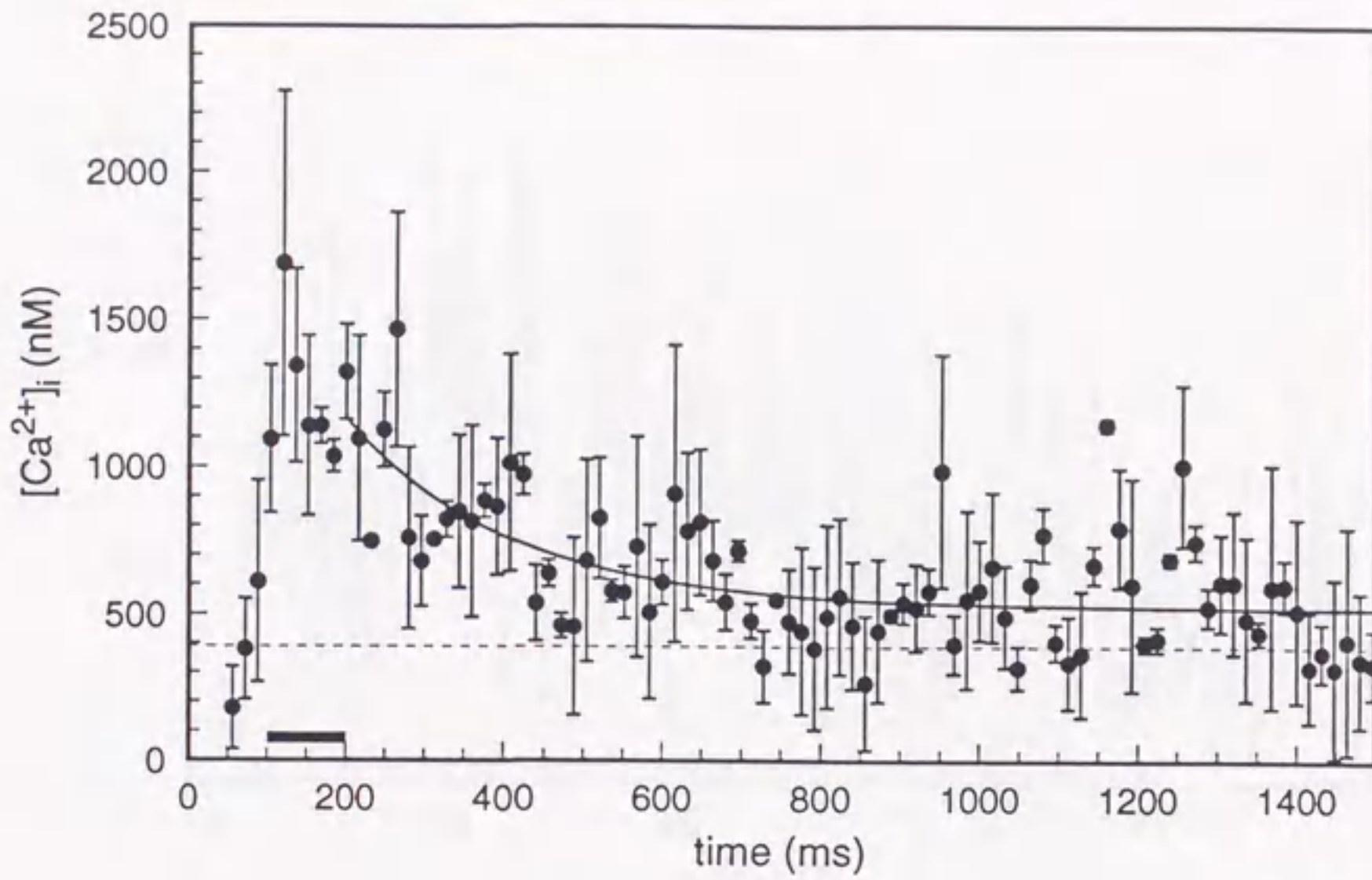


図 III-7 100 Hz で 20 回刺激した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化。A. $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液中での変化。最適曲線のパラメータは以下の通りである: $Ca_0 = 1200 \text{ nM}$; $\tau = 360 \text{ ms}$; $\Delta Ca^{2+} = 240 \text{ nM}$ 。また、 $[Ca^{2+}]_c = 370 \text{ nM}$ であった。B. 正常リンガー中での $[Ca^{2+}]_i$ の変化。最適曲線のパラメータは次の通りである: $Ca_0 = 840 \text{ nM}$; $\tau = 350 \text{ ms}$; $\Delta Ca^{2+} = 140 \text{ nM}$ 。 $[Ca^{2+}]_c = 254 \text{ nM}$ であった。

A.



B.

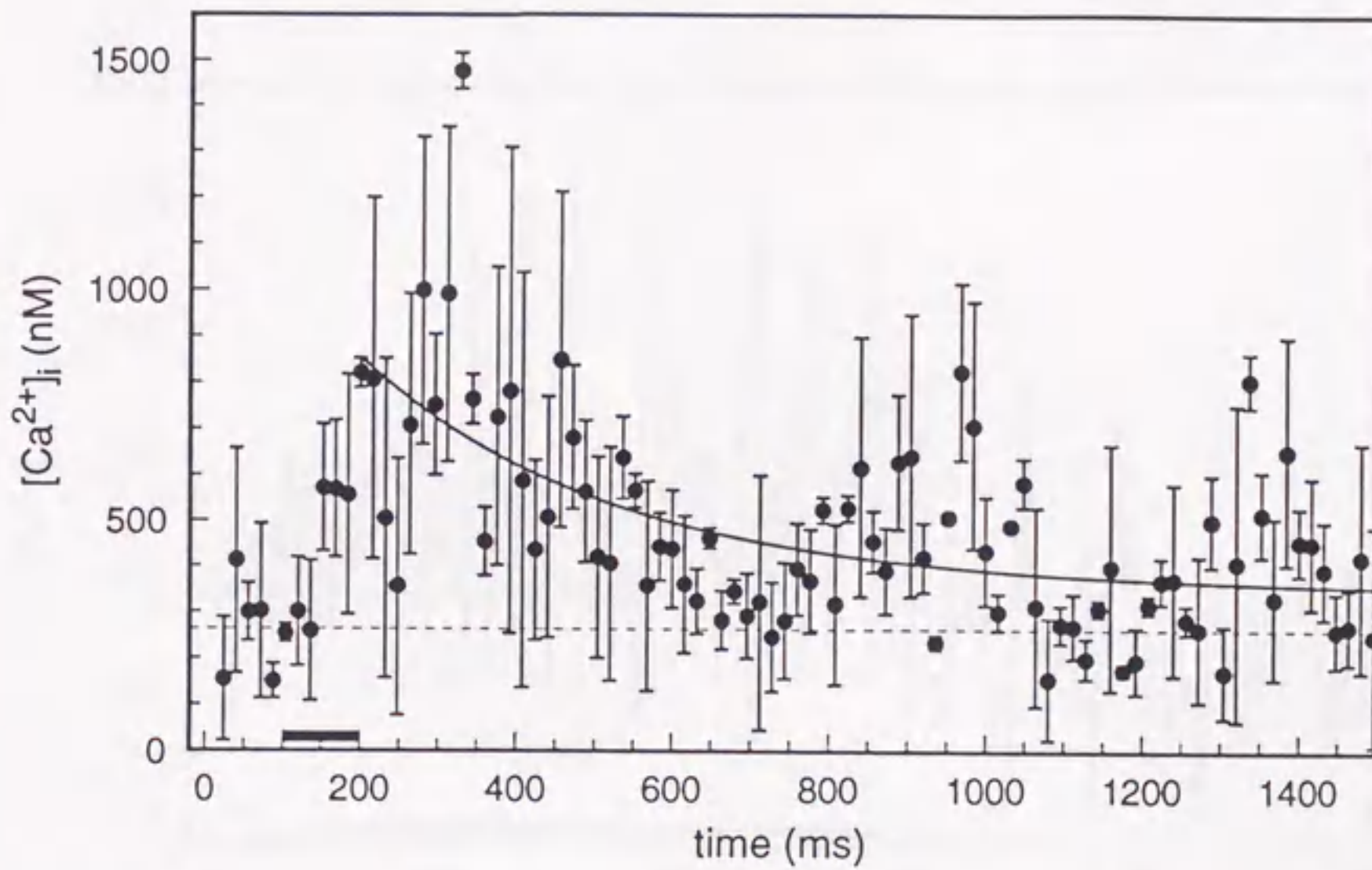
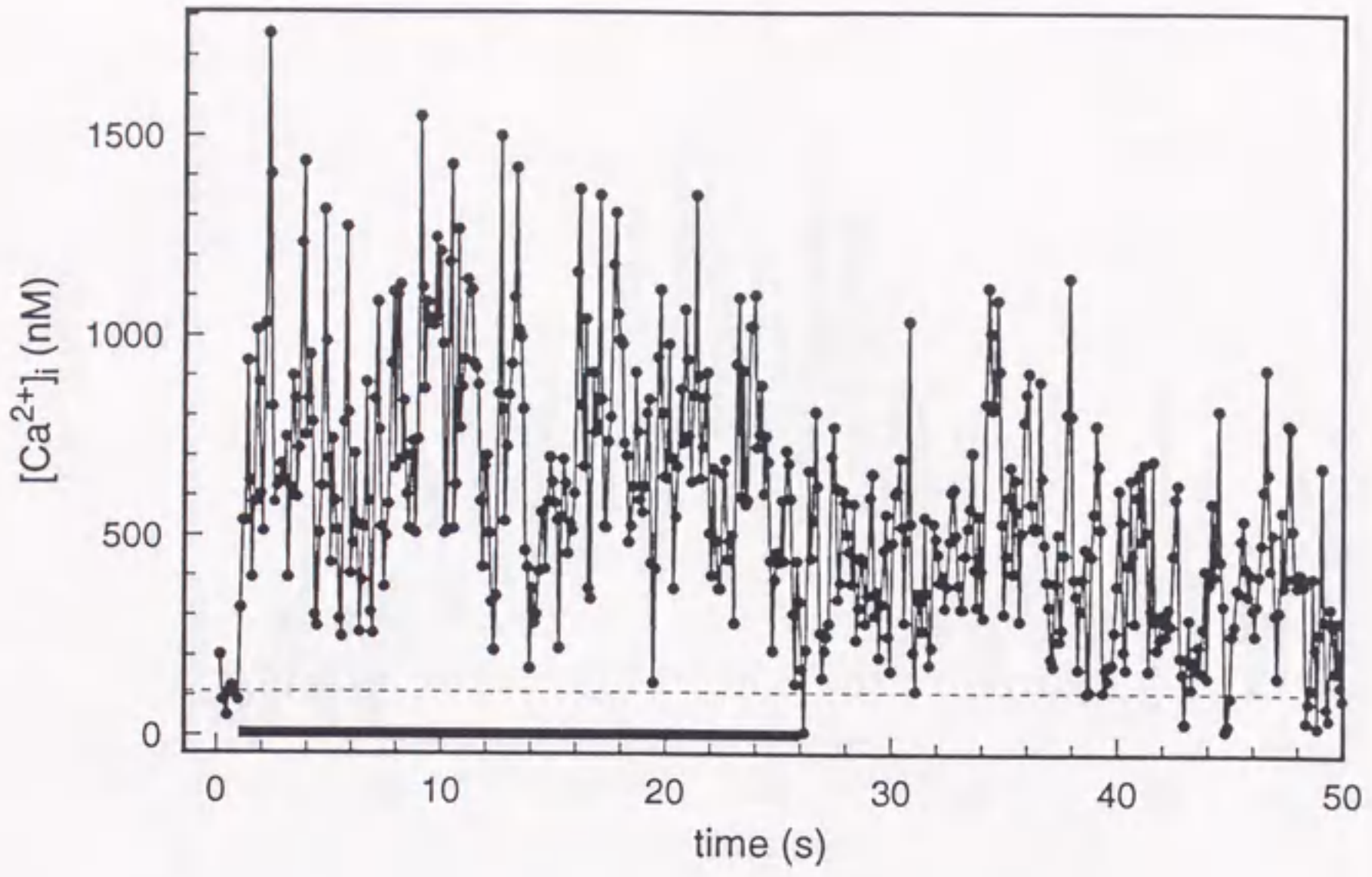
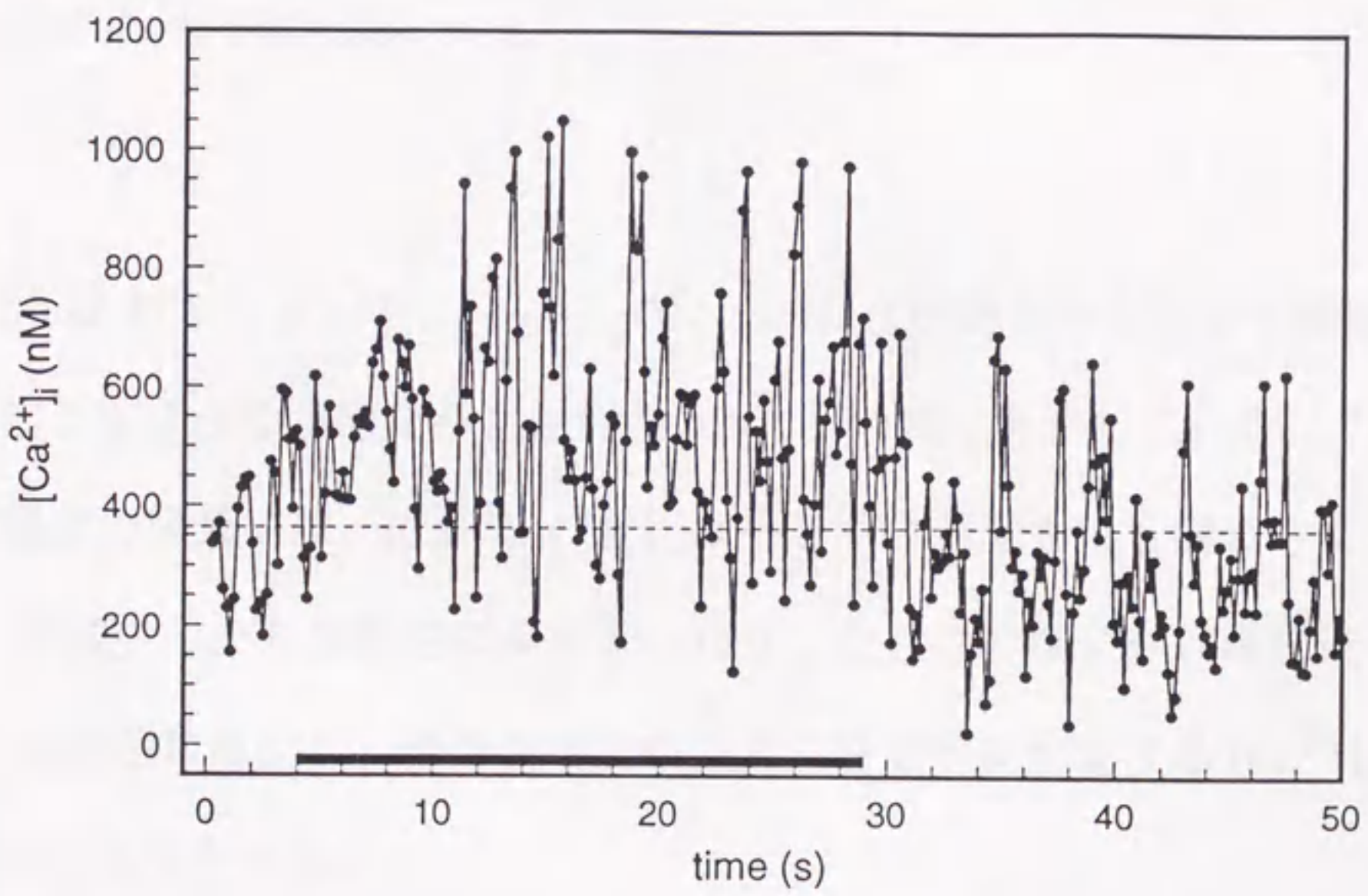


図 III-8 100 Hz で 10 回刺激した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化。A. $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液中での変化。最適曲線のパラメータの値は以下の通りである: $Ca_0 = 650$ nM; $\tau = 210$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 130$ nM。また、 $[Ca^{2+}]_c = 390$ nM であった。B. 正常リンガー中での $[Ca^{2+}]_i$ の変化。最適曲線のパラメータの値は次の通りである: $Ca_0 = 510$ nM; $\tau = 330$ ms; $Ca_{diff} = 85$ nM。 $[Ca^{2+}]_c = 264$ nM であった。

A



B



C

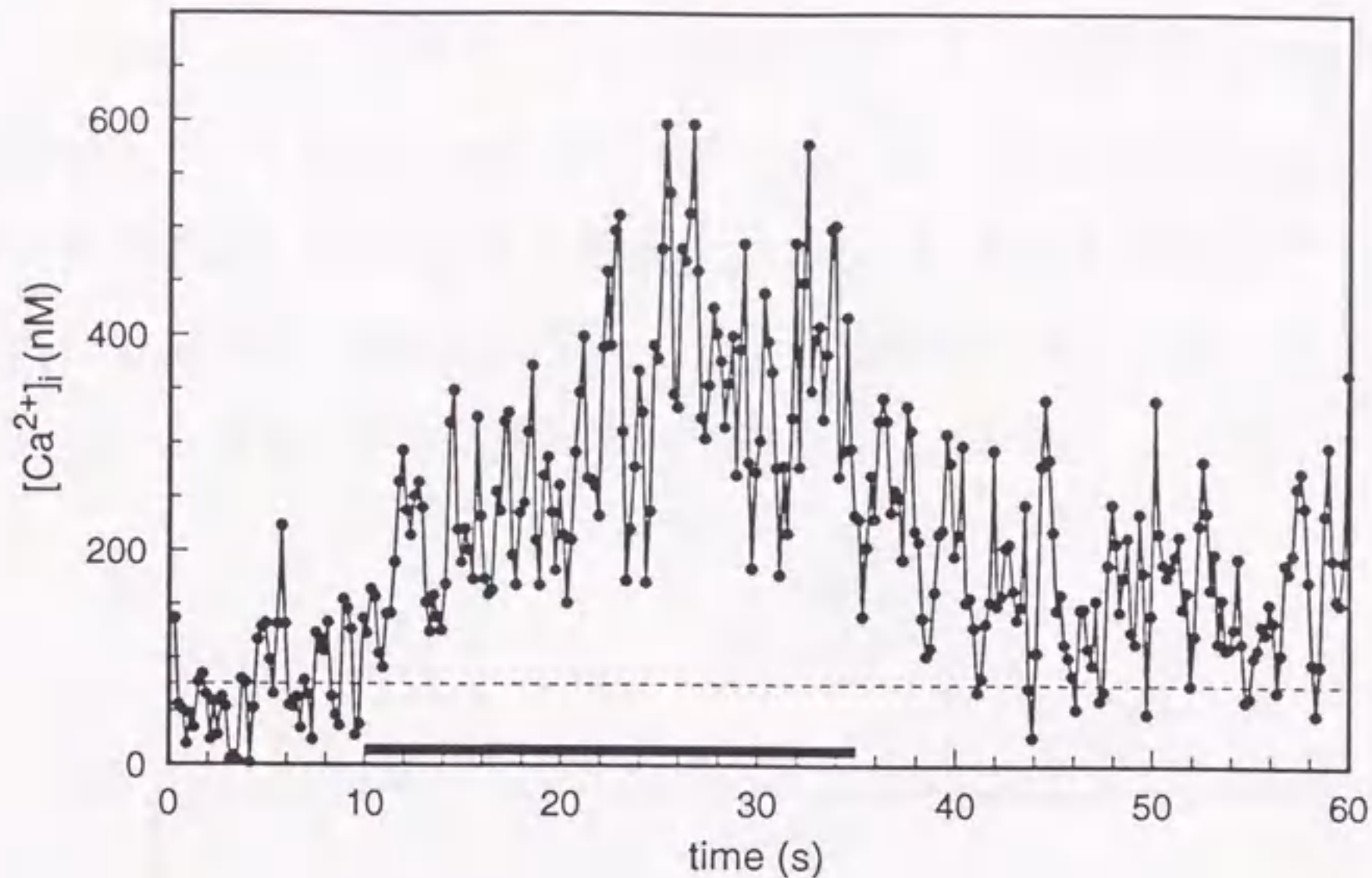


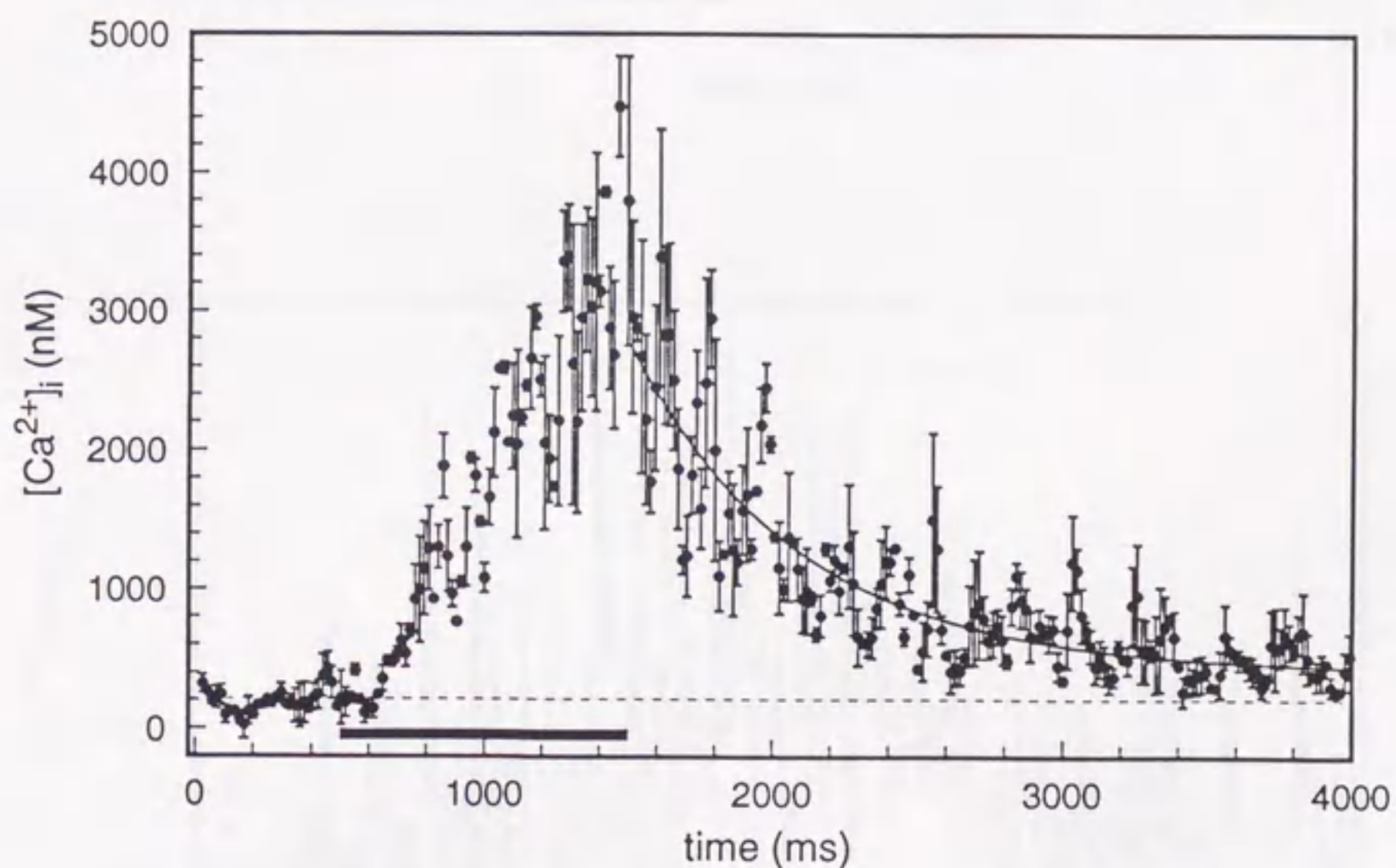
図 III-9 様々な $[Ca^{2+}]_e$ の条件で、20 Hz 500 回刺激した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化。A. 正常リンガー液中、B. Ca^{2+} 1.0 mM リンガー中、C. Ca^{2+} 0.5 mM リンガー中での $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示す。どの図においても、刺激中にもかかわらず $[Ca^{2+}]_i$ が減少し始めている。

図 III-9 は様々な $[Ca^{2+}]_e$ の条件下で、20 Hz 500 回という増進や増強を強く引き起こすような刺激を与えた時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示している。このような低頻度の刺激では、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化は小さく、刺激中にも関わらず $[Ca^{2+}]_i$ が減少したり振動的にふるまったりした。この場合も刺激直後の $[Ca^{2+}]_i$ は急速に減少し、増進や増強の減衰の時定数に相当する $[Ca^{2+}]_i$ の減衰は見当たらなかった。

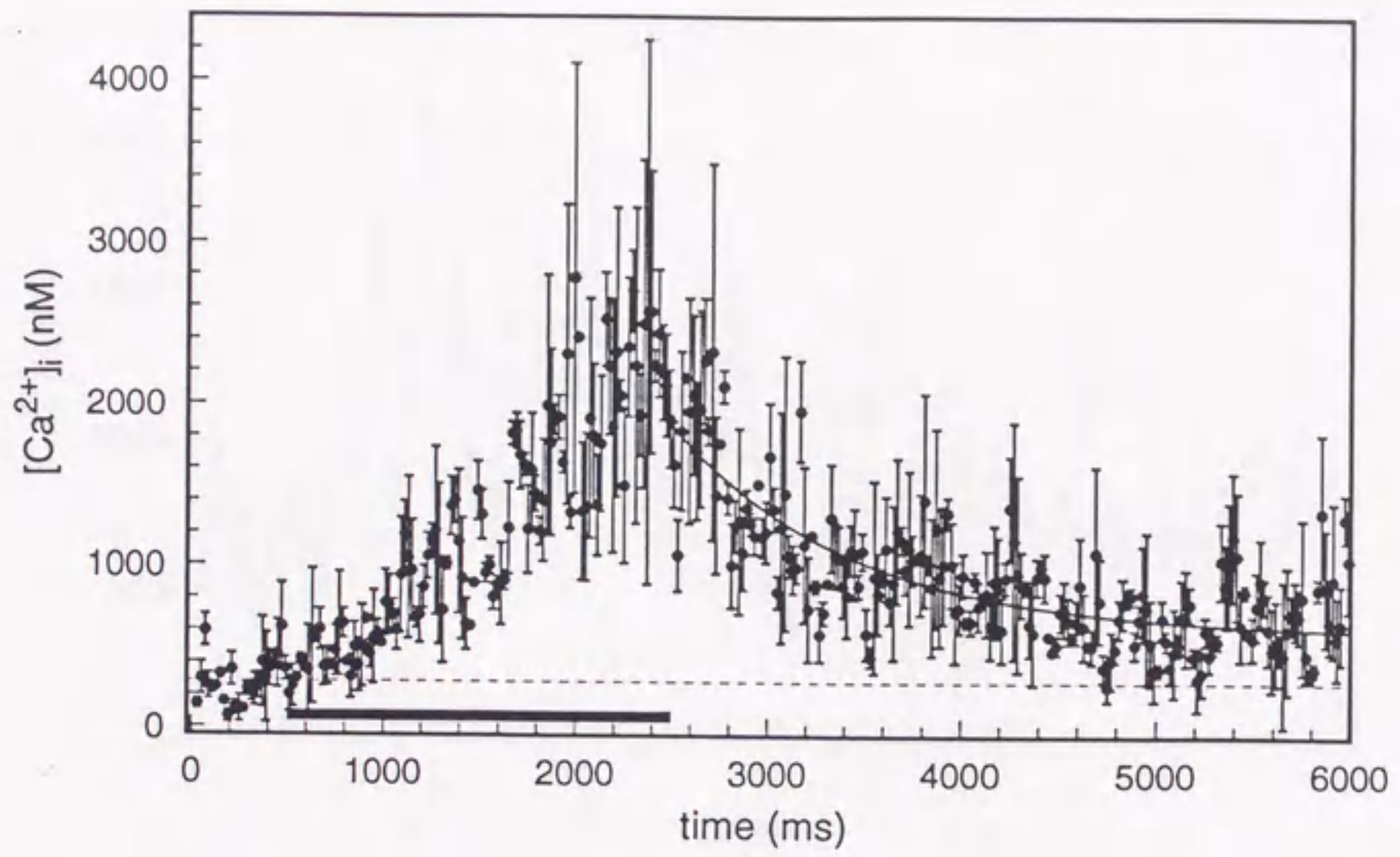
$[Ca^{2+}]_i$ の変化が最も大きい $Ca^{2+} \times 5$ のリンガー液中で、同じ回数刺激を異なる刺激間隔で同じシナプスに与えた場合の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を図 III-10

に示す。刺激間隔が大きくなるにつれて、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加の速さとピークの値も小さくなっていった。このように、刺激の頻度によって $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の度合いが変わるという事は、刺激間隔が長くなればなるほど刺激中にシナプス前末端内から排出される Ca^{2+} の量が多くなるという事を示唆している。つまりこれらの結果は、細胞外に排出したりや細胞内のカルシウムストアなどに取り込まれる速さが非常に速いという事を示している。

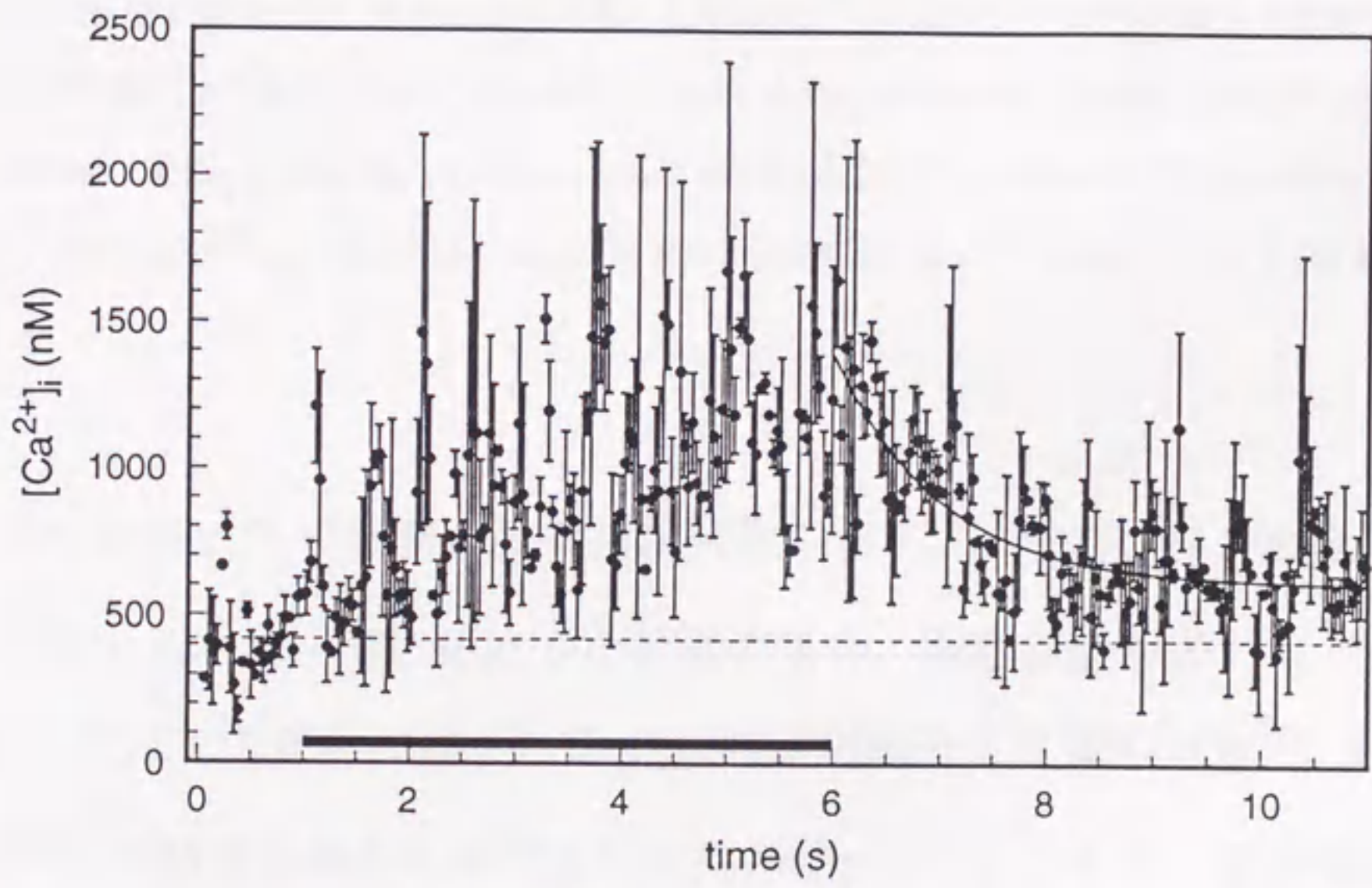
A



B



C



D

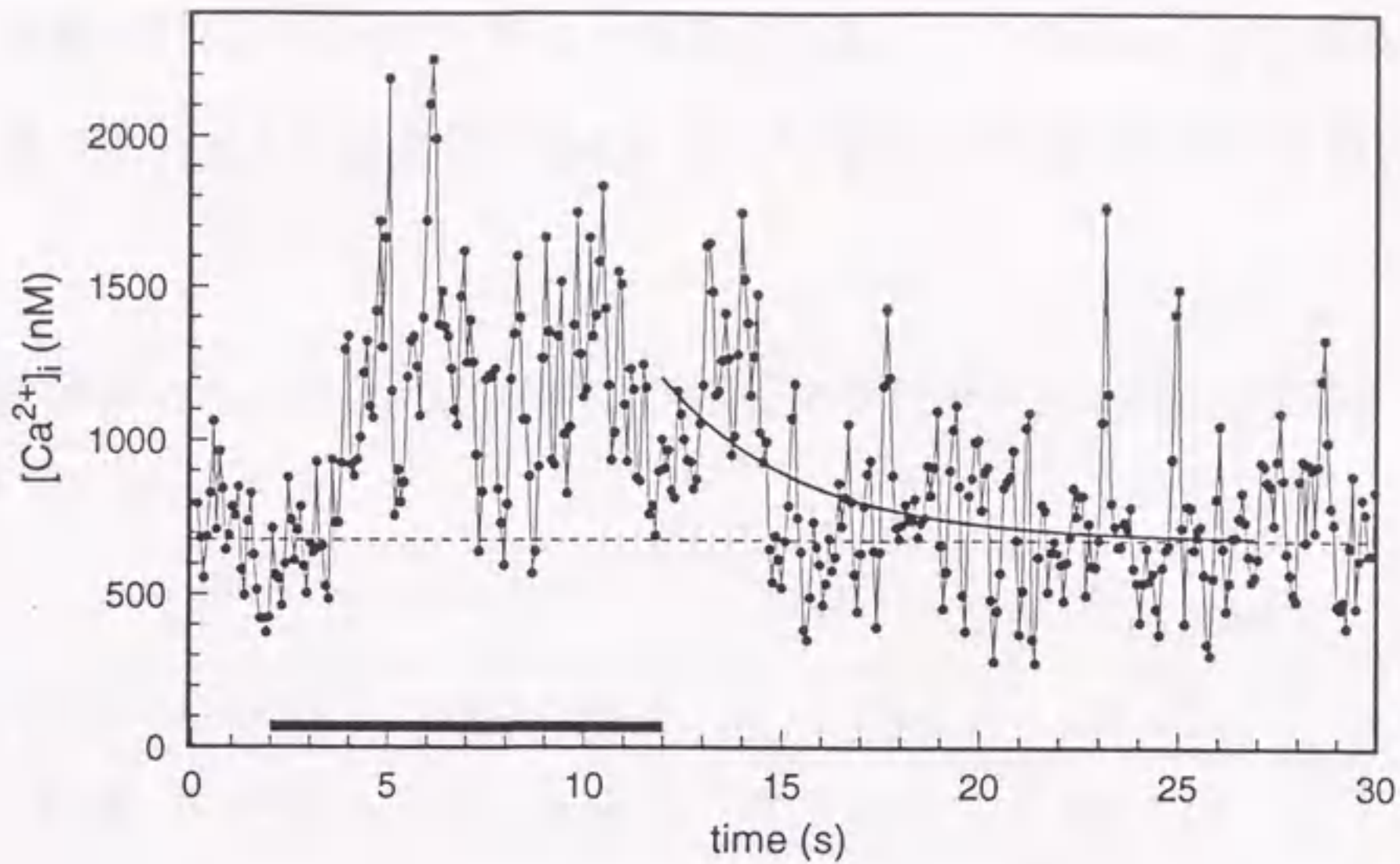


図 III -10 刺激間隔の違いによる $[Ca^{2+}]_i$ の変化の違い。 $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液中において 100 回の刺激を 100 Hz (A.), 50 Hz (B.), 20 Hz (C.), 10 Hz (D.) で刺激した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化。 $[Ca^{2+}]_i$ の減衰を最適曲線から得られた値と対照の Ca^{2+} 濃度はそれぞれ次の通りである: A; $Ca_0 = 2400$ nM; $\tau = 590$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 220$ nM; $[Ca^{2+}]_c = 195$ nM; B; $Ca_0 = 1300$ nM; $\tau = 930$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 300$ nM; $[Ca^{2+}]_c = 282$ nM; C; $Ca_0 = 780$ nM; $\tau = 990$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 190$ nM; $[Ca^{2+}]_c = 420$ nM; D; $Ca_0 = 520$ nM; $\tau = 3500$ ms; $\Delta Ca^{2+} = 0$ nM; $[Ca^{2+}]_c = 680$ nM。

各条件での $[Ca^{2+}]_i$ の減衰の最適指数関数のパラメータ(式 III-3)を表 III-1 に示す。これを見ると、同じ頻度での刺激の場合、刺激回数が多いほどつまり、流入した Ca^{2+} が多いほど、 Ca_0 (これは刺激終了直後の $[Ca^{2+}]_i$ を示す、 $[Ca^{2+}]_i$ の減衰曲線から推定された外挿値) は大きくなり、減衰時定数、 τ も遅くなる。ただ、100 Hz 100 回の刺激の場合は、50 回の時に比べて τ は速くなっているが、これは、高頻度で長く続く刺激により大量の Ca^{2+} が流入し、通常の状態では働かないような Ca^{2+} の排出装置(例えばミトコンドリア)

が働くためではないかと思われる。また、 $[Ca^{2+}]_i$ の減衰の時定数はシナプス伝達の短期可塑性の成分のうち遅い促進に相当し、この $[Ca^{2+}]_i$ の減衰で増進や増強を説明するのは困難である。詳しい事は次の項で議論する事にする。

表 III-1 いろいろな刺激条件での刺激後の $[Ca^{2+}]_i$ の減衰の様子。

A. $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液

stimulus patern	Ca_0 (nM)	τ (ms)	$[Ca^{2+}]_c$ (nM)	n
100Hz, 100 times	2000 ± 300	460 ± 120	170 ± 20	2
100 Hz, 50 times	1100 ± 200	650 ± 530	180 ± 40	2
100 Hz, 20 times	750 ± 180	400 ± 40	280 ± 60	4
100 Hz, 10 times	650	206	390	1
50 Hz, 100 times	1300	930	280	1
20 Hz, 100 times	780	990	420	1
10 Hz, 100 times	520	3500	680	1

B. 正常リンガー液

stimulus patern	Ca_0 (nM)	τ (ms)	$[Ca^{2+}]_c$ (nM)	n
100Hz, 100 times	910 ± 80	300 ± 70	220 ± 30	2
100 Hz, 50 times	960 ± 250	390 ± 130	260 ± 30	5
100 Hz, 20 times	540 ± 190	830 ± 480	230 ± 60	3
100 Hz, 10 times	507	325	264	1

この表は、各条件刺激の後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を式 III-3 でフィットした時の最も良くフィットした値を示している。A. は $Ca^{2+} \times 5$ リンガー液中、B は正常リンガー液中でのデータをまとめたものである。データは平均値 \pm S.E.M で表されており、平均値を得るのに用いたデータの個数を表の右端に示す(n)。

III-4. 議論

III-4-1. Indo-1 の軸索輸送の機構

私は軸索輸送という手法を用いて細胞内にカルシウム指示薬である Indo-1 を負荷することに初めて成功したが、この軸索輸送の機構には様々な説があり、定説はまだないと言って良い。

一般に、神経軸索には、末梢部分に必要なタンパク質などを輸送するための、ダイニン・キネシンなどから成る能動輸送の系が存在する。この輸送には、速い輸送(~ 400 mm/day; ~ 17 mm/h)と遅い輸送($1 \sim 2$ mm/day; $0.04 \sim 0.08$ mm/h)がある事が知られている(Nicholls et al. 1992)。しかし、これまでの研究から、蛍光指示薬などが軸索輸送される現象はこういった能動輸送ではなく単なる拡散で説明できるといわれてきた(Popov & Poo 1992; Fritsch 1993; Peng & Zucker 1993)。これらの文献では、蛍光指示薬の輸送速度が蛍光指示薬の拡散係数から予想される値と良く一致すること、能動輸送系で運ばれるであろう蛍光指示薬の dextran 共役物を用いると、分子量が大きくなるほど輸送速度が低下することなどを示し、これらの結果から能動輸送ではなく拡散で輸送されているに過ぎないという結論を出している。

本研究においても、軸索の断端から神経末端までの距離約 2cm を 12 ~ 24 時間以内の速さで蛍光色素が軸索輸送されたので、輸送速度については Peng & Zucker (1993)の結果とほぼ同じである。もし、拡散だけで蛍光色素の軸索輸送が行われているならば、温度を下げても、輸送速度は大きくは変化しないはずである。しかし、実験方法の項で述べた方法のうち温度のみを 7°C に下げて軸索輸送をさせたところ、わずかには神経末端まで色素が輸送されて

はいたが、顕微鏡での測定には不十分な量であった。このことから、蛍光色素の軸索輸送は単に拡散で受動的に輸送されているとは考えにくい。

また軸索は、切断してから数分以内に、断端が細胞膜で閉じてしまうという説もあるが(Fritsch 1993)、負荷開始後1~2時間してから、断端を蛍光指示薬の溶液からはずしてしまうと蛍光指示薬は細胞内には負荷されなかった。これについては、私の用いた条件が断端を閉じさせることなく長い時間かけて蛍光指示薬を負荷させるのに最適な条件であったのかもしれない。

いずれにせよ、蛍光指示薬などの軸索輸送の機構についてはさらなる検討が必要である。

III-4-2. シナプス前末端内での Ca^{2+} ダイナミクス

前述のように、細胞内には Ca^{2+} 濃度を細胞外に比べて低い一定の濃度に保つような様々な機構が存在する(図 I-4)。それらの機構について、近年、様々な研究がなされているがそれら相互の関係や、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した時にそれらの機構がどのような機序で働いているのかについては不明の点が多く残されている。

本研究で、細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激によって流入した後、急速に排出される事が解った。しかも、刺激中に減少しはじめたり、振動的に減少するような例も見られた。これらの現象は次のように考える事で説明が可能である。

まず、 Ca^{2+} チャネルを通して末端内に流入した Ca^{2+} は拡散によって細胞の内部へと拡がっていく。その後ある一定濃度まで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇すると、それに伴い Ca^{2+} -ATPase などのカルシウムポンプや Na^+ - Ca^{2+} exchanger など

が働き始めて、 Ca^{2+} が細胞内部のカルシウムストアに貯蔵され始めたり、細胞外へ排出されたりして $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加が抑えられる。またこの時、ある程度以上 Ca^{2+} が流入すると、細胞を守るために(大量の Ca^{2+} は細胞にとって有害なため)ミトコンドリアもカルシウムストアとして働き始める。さらに長い刺激の場合 Ca^{2+} 流入と、カルシウムストアへの取り込み及び細胞外への排出などの量が平衡になり、正味の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加はゼロになるが、これらの機構が動作する時間にずれがあると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激中にも関わらず減少したり振動したりすることが予想される。刺激が終了すると、細胞外からの流入は止まるが、流入部位から測定部位まで拡散してくる Ca^{2+} があるため、測定場所によっては刺激終了後もある程度の時間 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が下がらない場合も想定できる。その後 Ca^{2+} は、様々な Ca^{2+} 排出装置が働き急速に処理される。この時 Ca^{2+} を貯め込んだオルガネラから細胞内への Ca^{2+} 放出などがおこると、その放出が断続的に続いた場合、振動的に Ca^{2+} が減少する可能性がある。ある程度以上 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が減少すると、その先完全な静止状態のレベルに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を戻すためにはエネルギーを使った能動的な排出装置が働いていく必要があるため、その後は非常にゆっくりと減少していく。この非常にゆっくりと減少する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の成分が、結果の式 III-3 の ΔCa^{2+} に対応しているものと考えられる(cf. Pietrobon et al. 1990; McMahon & Nicholls 1991; Werth & Thayer 1994)。

以上の説明は、前述の実験結果を良く説明している。しかし、説明が正しいかどうかは、 Ca^{2+} の排出装置に影響を与える試薬などを用いた実験によりして、詳細に検討する必要がある。

III-4-3. シナプス伝達の短期可塑性への Ca^{2+} の寄与

前述のようにシナプス前末端内の Ca^{2+} は神経伝達物質の放出機構やシナプス伝達の短期可塑性に非常に重要な役割を占めていると考えられる。ここでは、前末端内の Ca^{2+} とシナプス伝達の可塑性との関わりについて議論する。

結果の項の表 III-1 で示したように、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰の時定数は、 $\text{Ca}^{2+} \times 5$ リンガー液中での 10 Hz 100 回刺激の例を除いて、数百ミリ秒であった。シナプス伝達の可塑性の成分の中で、この時定数に相当する成分は遅い促通である。それでは、遅い促通が残存 Ca^{2+} で全て説明できるという事になるのであろうか。それをここで断言してしまうのには問題がある。まず、今回の測定で得られた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は放出部位の Ca^{2+} 濃度を測っているわけではないという事である。放出装置はシナプス前末端内の放出部位領域に集中しており、シナプス伝達の可塑性に関連した機構も放出部位に局在している可能性がある。細胞内の Ca^{2+} の分布は Ca^{2+} 流入直後はかなり不均一である事がシミュレーションなどの結果からも明らかであるので(Kijima et al. *unpublished result*)、促通のような速い過程について議論するためには放出部位における局所的 Ca^{2+} 濃度を測定する必要がある。もうひとつの問題点はカルシウム指示薬である Indo-1 はカルシウムキレート剤でもある、という事である。つまり、カルシウム蛍光指示薬が負荷された細胞で測定された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化の仕方は、指示薬が負荷されていない細胞での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の仕方とは違ったものを見ているという可能性がある。辻 (1995) の結果によると、カエルの神経筋接合部シナプス前神経末端にカルシウムキレート剤である BAPTA を負荷した場合、残存 Ca^{2+} が直接関係しているであろう速い促通の時定数が

遅くなった。また、 Ca^{2+} ポンプなどを介して流入した Ca^{2+} が処理されると考えた場合でのシミュレーションでは、キレート剤の負荷によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰の時定数が大きくなった。このようなことから、Indo-1 存在下での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰は Indo-1 が負荷されていない場合に比べて遅くなっていることが考えられる。本実験での末端内の Indo-1 の濃度は、Indo-1 の蛍光強度から、 $100 \mu\text{M}$ 前後であると思われるが、その程度のカルシウムキレート剤が、実際の細胞内での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ダイナミクスにどの程度影響を及ぼすかははっきりとは解っていない。この点については、蛍光測定と電気生理の測定を組み合わせたり、シミュレーションで詳細を検討する必要がある。

また、前述のように BAPTA 負荷は遅い促通には影響を与えないので、遅い促通がこの残存 Ca^{2+} で起っているとは考えにくい。このことを検証するためには、BAPTA を負荷して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定する必要がある。

これまでに示してきた結果から確実に言える事は、増進や増強などの遅いシナプス伝達の可塑性については、残存 Ca^{2+} だけでは説明できない、という事である。これは、我々のグループのこれまでの研究の結果(Kijima & Tanabe 1988; Tanabe & Kijima 1992)や前章で述べたことと一致している。

謝辞

本研究の遂行にあたり、懇切丁寧に指導して頂いた名古屋大学大学院理学研究科教授木島博正先生に心から感謝いたします。

カエル神経筋接合部シナプス前末端での Ca^{2+} イメージングの研究を行うにあたって、快く共同研究の申し出を受けて頂いた佐賀医科大学教授久場健司先生をはじめ、第2生理学教室の皆様に深く感謝いたします。

佐賀医科大学での共同研究の折りに様々なご助言を頂いた、川崎医科大学成田和彦先生に深く感謝いたします。

トリニトロベンゼン誘導体であるHEATNBに興味を持ち、ラット小脳で実験をして頂き、御助言、御討論を賜りました、理化学研究所の伊藤正男先生、Ms. L. Karachotをはじめ、理化学研究所国際フロンティアシナプス機構研究チームの皆様に深く感謝いたします。

研究の遂行にあたり様々な助言をして頂いた名古屋大学大学院理学研究科助手鈴木直哉先生、 Ca^{2+} イメージングの研究を共同して遂行してくれた鈴木慎一君、レーザー共焦点顕微鏡のメンテナンスなどを行ってくれた大沼清君をはじめ、名古屋大学理学部物理学教室高次機能生物物理研究室(K研)の皆様には、日頃から多大なる御支援、御協力を頂き、心から感謝いたします。

また、米国神経科学会に参加した折りに渡航費用を助成して下さった、財団法人西秋奨学会に深く感謝いたします。

以上の方々をはじめ、日頃お世話になった方々に、ここに、心から感謝いたします。

参考文献

Adler, E. M., Augustine, G. J., Duffy, S. N. and Charlton, M. P. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J. Neurosci.* 11: 1496–1507, 1991.

Augustine, G. J. and Levitan, H. Neurotransmitter release and nerve terminal morphology at the frog neuromuscular junction affected by dye erythrosin B. *J. Physiol. Lond.* 334: 47–63, 1983.

Burgoyne, R. D. and Morgan, A. Ca^{2+} and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18: 191–196, 1995.

Delaney, K. R., Tank, D. W. and Zucker, R. S. Presynaptic calcium and serotonin-mediated enhancement of transmitter release at crayfish neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 11: 2631–2643, 1991.

Delaney, K. R. and Tank, D. W. A quantitative measurement of the dependence of short-term synaptic enhancement on presynaptic residual calcium. *J. Neurosci.* 14: 5885–5902, 1994.

Diliberto, P. A., Wang, X. F. and Herman, B. Confocal imaging of Ca^{2+} in cells. *A practical guide to the study of calcium in living cells* 40, ed. Nuccitelli, R. pp. 244–248, 1994. Academic Press, San Diego.

Dodge, F. A. Jr. and Rahamimoff, R. Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 193: 419–432, 1967.

Fatt, P. and Katz, B. Spontaneous subthreshold activity at the motor nerve endings. *J. Physiol. Lond.* 117: 109–128, 1952.

Fritzsche, B. Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J. Neurosci. Methods* 50: 95–103, 1993.

Fogelson, A. L. and Zucker, R. S. Presynaptic calcium diffusion from various arrays of single channels. *Biophys. J.* 48: 1003–1017, 1985.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. and Südhof, T. C. Synaptotagmin I: A major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717–727, 1994.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440–3450, 1985

Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals* (5th edition), ed. Larison, K. D. pp. 114, 1992. Molecular probes, Inc., USA.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. and Matthews, G. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371: 513–515, 1994.

Jahn, R. and Südhof, T. C. Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 219–246, 1994.

Kamiya, H. and Zucker, R. S. Residual Ca^{2+} and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371: 603–606, 1994.

Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y. Ca^{2+} binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys. J.* 53: 635–639, 1988.

Kao, J. P. Y. Practical aspects of measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ with fluorescent indicators. *A practical guide to the study of calcium in living cells* 40, ed. Nuccitelli, R. pp. 161–167, 1994. Academic Press, San Diego.

葛西 道生, 吉岡 亨, 木島 博正, 塚原 保夫, 栗原 賢三, 鈴木 英雄, 共編.
神経情報伝達分子. 培風館. pp. 159–161, 1988.

Katz, B. and Miledi, R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol. Lond.* 189: 535–544, 1967.

Kelly, R. B. Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72 / *Neuron* 10 (Suppl.): 43–53, 1993.

Kijima, H. and Tanabe, N. Calcium-independent increase of transmitter release at frog end-plate by trinitrobenzene sulphonic acid. *J. Physiol. Lond.* 403: 135–149, 1988.

Kobayashi, K. and Tachibana, M. Ca^{2+} regulation in the presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells. *J. Physiol Lond.* 483: 79–94, 1995.

Konishi, M., Olson, A., Hollingworth, S. and Baylor, S. M. Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* 54: 1089–1104, 1988.

Kuba, K., Hua, S-Y. and Hayashi, T. A UV laser-scanning confocal microscope for the measurement of intracellular Ca^{2+} . *Cell Calcium* 16: 205–218, 1994.

クフラー, ニコルス, マーチン. 金子章道, 小幡邦彦, 立花政夫, 共訳.
ニューロンから脳へ (第2版). 廣川書店, 1988.

Littleton, J. T. and Bellen, H. J. Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca^{2+} -dependent manner. *Trends Neurosci.* 18: 177–183, 1995.

Magleby, K. L. The effect of repetitive stimulation on facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 234: 327–352, 1973.

Magleby, K. L. and Stevens, C. F. The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol. Lond.* 223: 151–171, 1972.

Martin, A. R. A further study of the statistical composition of the end-plate potential. *J. Physiol. Lond.* 230: 114–122, 1955.

McMahon, H. T. and Nicholls, D. G. The bioenergetics of neurotransmitter release. *Biochim. Biophys. Acta*, 1059: 243–264, 1991.

Means, G. E. and Feeney, R. E. *Chemical Modification of Proteins*, pp. 121–123, 1971. Holden-day, Inc., San Francisco.

Nicholls, J. G., Martin, A. R. and Wallace, B. G. *From neuron to brain* (third edition). 1992. Sinauer Associates, Sunderland.

Nowycky, M. C. and Pinter, J. P. Time courses of calcium and calcium-bound buffers following calcium influx in a model cell. *Biophys. J.* 64: 77–91, 1993.

Osanai, M., Tsuji, A., Suzuki, N. and Kijima, H. Effects of trinitrobenzene analogs on short-term synaptic plasticities at the frog neuromuscular junction. *Jpn. J. Physiol.* (suppl.) 45: 1995 *in press*.

Osanai, M., Tsuji, A., Suzuki, N. and Kijima, H. Presynaptic effects of a trinitrobenzene analogue at the frog neuromuscular junction. *J. Neurophysiol.* *in press*.

Peng, Y-Y. and Zucker, R. S. Release of LHRH is linearly related to the time integral of presynaptic Ca^{2+} elevation above a threshold level in bullfrog sympathetic ganglia. *Neuron* 10: 465–473, 1993.

Pietrobon, D., Di Virgilio, F. and Pozzan, T. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 193: 599–622, 1990.

Popov, S. and Poo, M-M. Diffusional transport of macromolecules in developing nerve processes. *J. Neurosci.* 12:, 77–85, 1992.

Regehr, W. G., Delaney, K. R. and Tank, D. W. The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse. *J. Neurosci.* 14: 523–537, 1994.

Robitaille, R. and Charlton, M. P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12: 297–305, 1992.

Simon, S. M. and Llinás, R. R. Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys. J.* 48: 485–498, 1985.

Südhof, T. C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645–653, 1995.

Tanabe, N., Kijima, H. and Maruhashi, J. Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) increases transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Proc. Japan Acad.* 63: Ser. B, 39–42, 1987.

Tanabe, N. and Kijima, H. Transmitter release at frog end-plate loaded with a Ca^{2+} -chelator, BAPTA: hypertonicity and erythrosin B augment the release independently of internal Ca^{2+} . *Neurosci. Lett.* 92: 52–57, 1988.

Tanabe, N. and Kijima, H. Both augmentation and potentiation occur independently of internal Ca^{2+} at the frog neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.* 99: 147–152, 1989.

Tanabe, N. and Kijima, H. Ca^{2+} -dependent and -independent components of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 455: 271–289, 1992.

辻文子. カエル神経筋接合部における速い促通の時定数を決めるものは何か. 名古屋大学大学院理学研究科, 修士論文, 1995.

Werth, J. L. and Thayer, S. A. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 14: 348–356, 1994.

Wu, L.G. and Saggau, P. Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 14: 645–654, 1994.

- Yawo, H. and Momiyama, A. Re-evaluation of calcium currents in pre- and postsynaptic neurons of the chick ciliary ganglion. *J. Physiol. Lond.* 460: 153–172, 1993.
- Zengel, J. E. and Magleby, K. L. Changes in miniature endplate potential frequency during repetitive nerve stimulation in the presence of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} at the frog neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 77: 503–529, 1981.
- Zengel, J. E. and Magleby, K. L. Augmentation and facilitation of transmitter release. *J. Gen. Physiol.* 80: 583–611, 1982.
- Zengel, J. E. and Sosa, M. A. Changes in MEPP frequency during depression of evoked release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 497: 267–277, 1994.
- Zengel, J. E., Sosa, M. A., Poage, R. E. and Mosier, D. R. Role of intracellular Ca^{2+} in stimulation-induced increase in transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 104: 337–355, 1994.
- Zimmermann, H., Volkandt, W., Wittch, B. and Hausinger, A. Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J. Physiol. Paris* 87: 159–170, 1993.

※2011.12.9 写真データより PDF 作成

※原本でもページ番号 45 は飛ばされている

(NAGOYA Repository)