

アセチルコリン放出を担う培養交感神経終末 Ca²⁺ チャネルの解析

森 倫 範 谷 藤 章 太 小 西 真 人
持 田 澄 子

東京医科大学大学院医学研究科細胞生理学講座

【要旨】 シナプス前終末に到達した活動電位は、シナプス小胞から伝達物質を放出させてシナプス後細胞へ化学信号を伝達する。中枢神経では、シナプス前終末アクティブゾーンに発現する P/Q-、N-、R-型 Ca²⁺ チャネルが、シナプス小胞の開口を担う。本研究は、特異的阻害剤のアセチルコリン (ACh) 放出阻害効果を指標として、培養交感神経節細胞アクティブゾーン Ca²⁺ チャネルの発現を解析した。N-型阻害剤 (5 μM) を単独投与すると、N-型が担う ACh 放出量は 94% 減少した。P/Q-型阻害剤 (250 nM)、あるいは、R-型阻害剤 (250 nM) を投与してから N-型阻害剤を投与すると、P/Q-型、あるいは R-型 Ca²⁺ チャネルが担う ACh 放出量が 7-10%、0.6%、N-型 Ca²⁺ チャネルが担う ACh 放出量は 90-92% 減少し、N-型 Ca²⁺ チャネルが主であるが、P/Q-型 Ca²⁺ チャネルの発現も示唆された。

はじめに

化学シナプスでは、神経活動によってシナプス小胞から放出される伝達物質がシナプス後細胞に化学信号として情報を伝達する。無芯シナプス小胞開口放出は、活動電位の神経終末への到達に伴い、膜の脱分極を感知して開口する電位依存性 Ca²⁺ チャネル (voltage-dependent calcium channel, VDCC) から流入する Ca²⁺ によって、Ca²⁺ 流入開始後 200 μ 秒以内に起こる¹⁾。VDCC は、α1、α2-δ、β、γ サブユニットで構成される²⁾。約 2,000 のアミノ酸残基からなる α1 サブユニット (190-250 kDa) は、4 つの膜貫通ホモログドメイン³⁾ の S4 部位で活動電位を感知して、Ca²⁺ 選択透過性を持つ孔ループを開口する⁴⁾。α1 サブユニットのアミノ酸配列の違いによって L-、N-、P/Q-、R-、T-型に分類される Ca²⁺ チャネルは、活性化閾値、不活性化までの時間、阻害剤への感受性が異なる⁵⁾ ので、シナプス小胞開口が起こるアク

ティブゾーン部位に発現する Ca²⁺ チャネル²⁾ のタイプによってシナプス小胞開口放出の時間経過が異なることが推察される。

N-、P/Q-、R-型 Ca²⁺ チャネルが中枢神経系でのシナプス小胞開口放出を担う⁶⁾。ラットおよびマウスの海馬神経や Calyx of Held シナプス前終末では N-、P/Q-と R-型が混在し⁷⁻⁹⁾ し、グルタミン酸を含有する無芯小胞開口放出を引き起こす。一方、末梢神経系である運動神経終末では、主として P/Q-型¹⁰⁾ が無芯小胞からの ACh 放出を担っている。また、交感神経からのノルアドレナリン (NA) を含有する有芯小胞の放出は主に N-型チャネルが担っている¹¹⁾¹²⁾。中枢 / 末梢神経系での多種の VDCC の混在や使い分けの原理はいまだ不明である。

ラット上頸交感神経節 (Superior cervical ganglion, SCG) 後神経は、培養下、伝達物質を ACh に変化させる¹³⁾¹⁴⁾。Mochida らは 4-6 週間培養 SCG 神経の ACh の放出を N-型が担うと¹⁵⁾¹⁶⁾ 報告し、上頸交感

平成 25 年 2 月 18 日受付、平成 25 年 6 月 12 日受理

キーワード: シナプス前終末、Ca²⁺ チャネル、神経伝達物質、シナプス小胞開口放出、培養上頸交感神経節細胞 (別冊請求先: 〒160-8402 東京都新宿区西新宿 6-1-1 東京医科大学大学院医学研究科細胞生理学講座)

TEL: 03-3351-6141 (内線: 248) FAX: 03-5379-0658

神経節シナプスを fast synapse (無芯シナプス小胞開口放出) のモデルとして、シナプス前終末蛋白質の機能解析¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾ を主としたシナプス伝達の解析に多用してきた¹⁹⁾²⁰⁾。長期培養細胞体には N-、L-、R-型が発現している¹⁶⁾。一方、摘出ラット SCG 神経細胞体には N-型 (49%)、P/Q-型 (11%)、L-型 (21%)、R-型 (20%) が発現していると近年報告され²¹⁾、P/Q-型の発現が全くないという以前の報告²²⁾²³⁾ と一致しない。本研究では、特異性の高い N-、P/Q-、R-型 Ca²⁺ チャンネル阻害剤を用いて 5-9 週間培養 SCG 神経細胞のコリン作動性シナプス前終末アクティブゾーンに発現する VDCC を詳細に解析してこれまでに報告された上頸交感神経に発現する VDCC の分布と比較検討するとともに、ACh を伝達物質として放出する交感神経終末に発現する VDCC を考察する。

研究材料および方法

本研究は日本生理学会動物実験等の実施に関する基本指針および東京医科大学動物実験規程 (2007) に沿って、生後 7 日の Wister/ST 系ラットの上頸交感神経節摘出手術と術後処置を行った。細胞の単離および培養方法に関しては、これまで報告した方法と同様に行った¹⁵⁻¹⁷⁾¹⁹⁾²⁴⁾。実験には 5-9 週間培養した SCG 神経細胞を用いた。実験開始直前にペトリディッシュ内の培養液を Modified Kreb's と交換し¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾、室温にて 0.1 ml/min でディッシュ内を灌流した。倒立型顕微鏡観察下で近接する 2 つの SCG 神経細胞に、ガラス管微小電極を刺入して、

外液に置いた基準電極との電位差を測定し、静止膜電位とした。次に、一方の神経細胞に 15 m 秒の矩形波電流 (1-1.5 nA) を 0.1 Hz で注入して活動電位を発生させ、他方の神経細胞から興奮性シナプス後電位 (Excitatory Post Synaptic Potential: EPSP) を記録した (Fig. 1)。微小電極用ガラス管の抵抗値は 60-110 MΩ となるように作製した。0.1 Hz で EPSP を記録し EPSP の振幅がほぼ一定の大きさに記録されるのを確認した約 20 分後に、Ca²⁺ チャンネル特異的阻害剤 N-型: ω-conotoxin GVIA (PEPTIDE INSTITUT, INC)、P/Q-型: ω-agatoxin IVA (PEPTIDE INSTITUT, INC)、R-型: SNX-482 (PEPTIDE INSTITUT, INC) の最終濃度がそれぞれ 5 μM、250 nM、250 nM になるように、マイクロピペットを用いて細胞外液 1.5 ml 中に、15 μl、3.75 μl、3.75 μl を滴下投与した。ω-conotoxin GVIA の投与実験では、5 μM ω-conotoxin GVIA 投与後 40 分間 EPSP を記録した後、シナプス前細胞への電流注入を停止して、シナプス後細胞の基線ノイズを 3 分間記録計測した (Fig. 2)。ω-agatoxin IVA または SNX-482 の投与実験では、250 nM ω-agatoxin IVA または 250 nM SNX-482 を投与 20 分後に 5 μM ω-conotoxin GVIA を投与し、その後 20 分間 EPSP を記録した (Fig. 3、4)。

Ca²⁺ チャンネル阻害剤投与前 10 分間の EPSP 振幅の平均値をコントロールとして、阻害剤投与後 10-20 分間の EPSP 振幅の平均値、次の阻害剤投与後 5-20 分間の EPSP 振幅の平均値、さらに 3 分間の基線ノイズ振幅の平均値をコントロール値で正

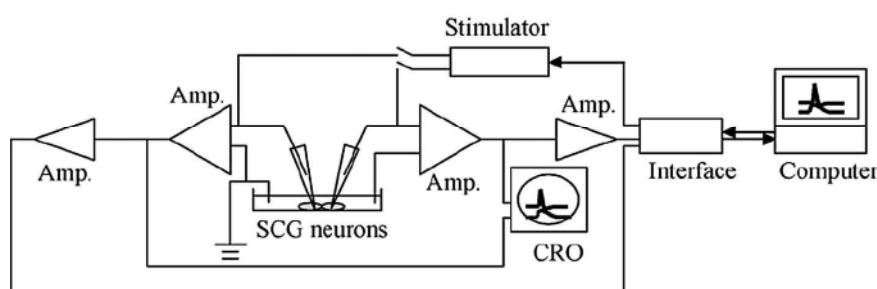


Fig. 1 Schema of EPSP recording in cultured SCG neurons²⁾³³⁾.

Conventional intracellular membrane potential recordings were obtained from two neighboring neurons using microelectrodes. EPSPs were recorded from each neuron while action potentials were generated in another neuron by passing 1-2 nA current for 20 ms through an intracellular recording electrode using microelectrode amplifiers (Amp, Nihon Kohden, Tokyo). Action potential was triggered by command using Clampex 10.2 (Molecular Devices, Downingtown, PA) and a stimulator (Nihon Kohden, Tokyo). Action potential and EPSP were monitored with a cathode ray oscilloscope (CRO, Nihon Kohden, Tokyo) and a computer. Data were collected through an interface (AD converter, Digidate 1440A, Molecular Devices, Downingtown, PA) using Clampex 10.2 and analyzed with the Origin 8 software (OriginLab, Northampton, MA).

規化した。正規化した5-10例で記録時間を揃えて平均し、その平均値と標準誤差をデータ解析ソフト Origin 8 (Microcal) で計測するとともに、その平均値を8点移動スムージングした値を赤線で表し比較した (Fig. 2A、3A、4A)。 ω -conotoxin GVIA の投与群の平均 EPSP 振幅から基線ノイズ振幅の平均値を差し引いて、 ω -conotoxin GVIA によって抑制される EPSP 振幅と抑制されない EPSP 振幅の大きさから、活動電位によって起こる伝達物質放出に関与する N-型 Ca^{2+} チャンネルと N-型以外の Ca^{2+} チャンネルの割合をパーセントで表した (Fig. 2B)。 ω -agatoxin IVA と ω -conotoxin GVIA の投与群の平均 EPSP 振幅から基線ノイズ振幅の平均値を差し引いて、 ω -agatoxin IVA または SNX-482 と ω -conotoxin GVIA によって抑制される EPSP 振幅の大きさから、N-型、P/Q-、R-型 Ca^{2+} チャンネルの割合をパーセントで表した (Fig. 3B、4B)。

結 果

1. SCG 神経細胞からの伝達物質放出を担う N-型 Ca^{2+} チャンネルの割合

N-型 Ca^{2+} チャンネル活性を完全に抑制すると報告されている $5 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA¹⁶⁾¹⁸⁾²⁵⁾ 投与群では、投与後 10-20 分の EPSP の振幅が $88.3 \pm 0.4\%$ (平均値 \pm 標準誤差) 減少した (Fig. 2A)。基線ノイズ値 $6.1 \pm 0.3\%$ (Fig. 2A) を差し引くと、 ω -conotoxin GVIA によって EPSP の振幅が 94% 減少し、6% が

ω -conotoxin GVIA によって抑制されずに残存したことになる (Fig. 2B)。この結果は、1) SCG 神経細胞からの伝達物質放出を N-型 Ca^{2+} チャンネルがほぼ担うが、N-型以外の Ca^{2+} チャンネルも発現している、2) $5 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA が伝達物質放出を完全に抑制する濃度ではなかった、という2つの可能性を示唆する。

2. SCG 神経細胞からの伝達物質放出を担う P/Q-および N-型 Ca^{2+} チャンネルの割合

次に、上記1)の可能性と P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルの発現を検討するために、P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルを完全に抑制すると報告されている 250 nM ω -agatoxin IVA⁹⁾¹⁶⁾ 投与したところ、投与後 10-20 分の EPSP の振幅が $83.9 \pm 0.8\%$ 減少した (Fig. 3A)。続いて $5 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA を投与すると、投与後 5-20 分の EPSP の振幅がノイズ値とほぼ同様な値 ($6.4 \pm 0.1\%$ Fig. 3A) であった。そこで、基線ノイズ値分を差し引くと、EPSP 振幅は ω -agatoxin IVA によって 10% 減少、 ω -conotoxin GVIA によって 89% 減少し、0.3% が薬物によって抑制されなかったことになる (Fig. 3A、B)。この結果から、上記2)の可能性はほぼ否定され、P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルも発現していて伝達物質放出に関与するが、N-型 Ca^{2+} チャンネルの関与が大であることを確認したことになる。ところが、 ω -agatoxin IVA 投与群 10 例中、6 例では EPSP の振幅が変化せず、4 例で $26.5 \pm 4.0\%$ 振幅が

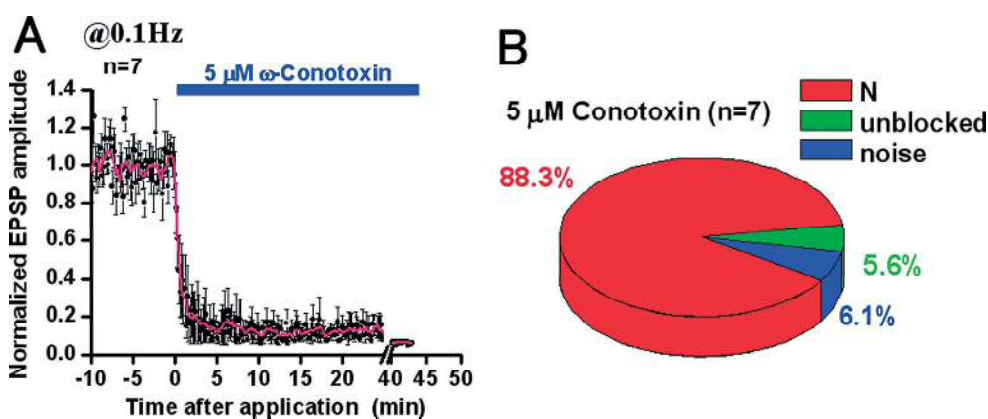


Fig. 2 Contribution of N-type Ca^{2+} channels to synaptic transmission in cultured SCG neurons. A: EPSP was recorded at 0.1 Hz. After stable EPSP recording for more than 10 min, ω -conotoxin GVIA was drop-applied at $t=0$. Normalized and averaged EPSP amplitudes ($\bullet \pm \text{SEM}$) from 7 experiments with a smooth value (red line) were plotted against recording time. B: Fraction of N-type Ca^{2+} channels mediating neurotransmitter release (red) (%) estimated from averaged reduction in EPSP amplitudes during 10-20 min after drop-application of ω -conotoxin GVIA and 40-43 min for noise (blue). Unblocked (green) was calculated from remaining EPSP amplitude, suggesting Ca^{2+} channels insensitive to ω -conotoxin GVIA.

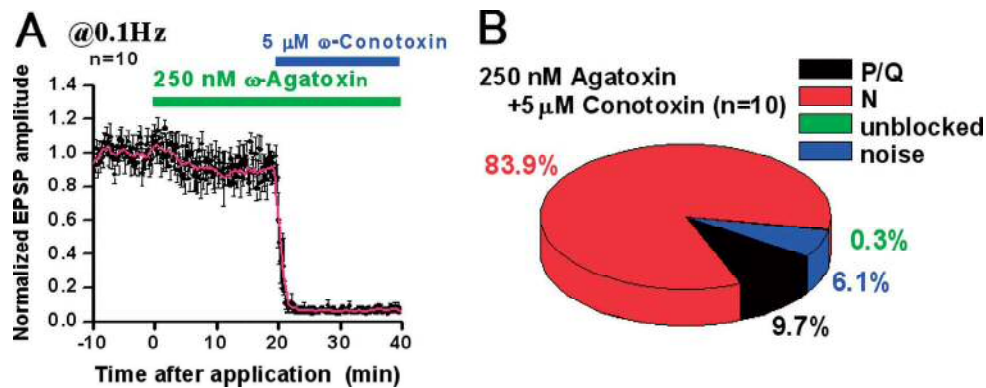


Fig. 3 Contribution of P/Q- and N-type Ca²⁺ channels to synaptic transmission in cultured SCG neurons.

A: EPSP was recorded at 0.1 Hz. At $t=0$, 250 nM ω -agatoxin IVA, and at 20 min 5 μ M ω -conotoxin GVIA were drop-applied. Normalized and averaged EPSP amplitudes ($\bullet \pm$ SEM) from 10 experiments with a smooth value (red line) were plotted against recording time.

B: Fraction of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating neurotransmitter release (%) estimated from averaged reduction in EPSP amplitudes during 10-20 min for P/Q-type (black), 25-40 min for N-type (red) and 40-43 min for noise (blue) after drop-application of Ca²⁺ channel blockers. Unblocked (green) was calculated from remaining EPSP amplitude, suggesting Ca²⁺ channels insensitive to ω -agatoxin IVA and ω -conotoxin GVIA.

減少したことから、神経終末によっては P/Q-型 Ca²⁺ チャンネルが発現しており伝達物質放出に寄与するが、N-型 Ca²⁺ チャンネルはどのシナプス前終末でも主として伝達物質放出に寄与することを示唆する。

3. SCG 神経細胞からの伝達物質放出を担う R-、N-および P/Q-型 Ca²⁺ チャンネルの割合

次に、R-型 Ca²⁺ チャンネルの発現を検討するため、R-型 Ca²⁺ チャンネルを完全に抑制すると報告されて

いる 250 nM SNX-482¹⁶⁾²⁶⁾ 投与したところ、投与後 10-20 分の EPSP の振幅が $0.6 \pm 0.6\%$ 減少した。続いて 5 μ M ω -conotoxin GVIA を投与したところ、投与後 5-20 分の EPSP の振幅が $86.8 \pm 0.6\%$ 減少したが 6.5% EPSP の振幅が残存した。基線ノイズ値を差し引くと、EPSP の振幅は、SNX-482 により 0.6% 減少し、 ω -conotoxin GVIA により 92.4% 減少し、6.9% が薬物によって抑制されなかったことになる (Fig. 4A, B)。これらの結果から、SCG 神経細胞シナプスでの伝達物質放出に R-型 Ca²⁺ チャンネルはほとん

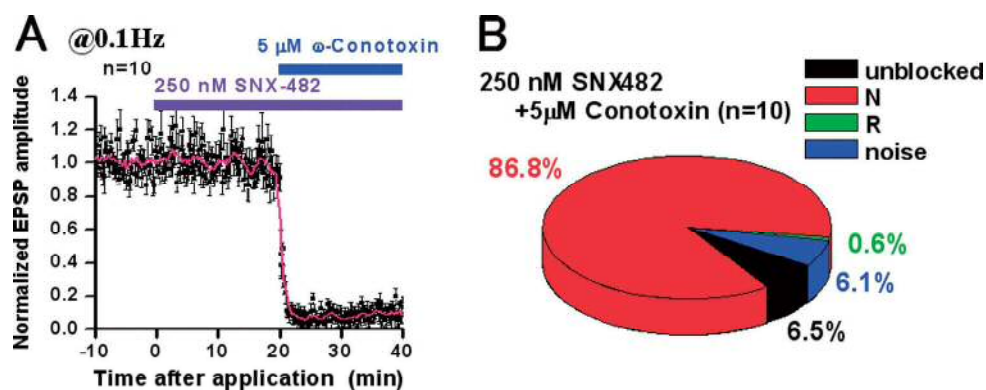


Fig. 4 Contribution of R- and N-type Ca²⁺ channels to synaptic transmission in cultured SCG neurons.

A: EPSP was recorded at 0.1 Hz. At $t=0$, 250 nM SNX-482, and at 20 min 5 μ M ω -conotoxin GVIA were drop-applied. Normalized and averaged EPSP amplitudes ($\bullet \pm$ SEM) from 10 experiments with a smooth value (red line) were plotted against recording time.

B: Fraction of N- and R-type Ca²⁺ channels mediating neurotransmitter release (%) estimated from averaged reduction in EPSP amplitudes during 10-20 min for R-type (green), 25-40 min for N-type (red) and 40-43 min for noise (blue) after drop-application of Ca²⁺ channels blockers. Unblocked (black) was calculated from remaining EPSP amplitude, suggesting Ca²⁺ channels insensitive to SNX-482 and ω -conotoxin GVIA. (black), indicating residual unidentified value. Individual percent (%) calculated.

ど寄与していないが、N型 Ca^{2+} チャンネルが大きく寄与していることが再確認された。また、両阻害剤投与後に残存する EPSP の振幅は、わずかな P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルの寄与を示唆する。

さらに、P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルの発現を再検討するために、SNX-482、 ω -conotoxin GVIA に続いて ω -agatoxin IVA を投与した実験 5 例中、 ω -conotoxin GVIA 投与後に残存する EPSP が ω -agatoxin IVA によって 1 例でのみ抑制された (data not shown)。この結果から、すべてのシナプス前終末に P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルが発現していないことが再確認された。

考 察

培養 SCG 神経細胞シナプス前終末アクティブゾーンの N-、P/Q-、R-型 Ca^{2+} チャンネルの発現と機能を検討した本研究は、1) シナプス前終末に発現した N-型 Ca^{2+} チャンネルが伝達物質放出に機能しているとの以前の研究結果¹⁵⁾¹⁶⁾ を再確認するとともに、2) P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルはすべてのシナプス前終末に発現しているのではないが、発現していれば機能する、3) R-型 Ca^{2+} チャンネルは寄与していないことを明らかにした。また、薬理的に興味深いことに、N-型 Ca^{2+} チャンネル特異的阻害剤効果は、阻害剤の投与の順序に従って阻害効果が強く表れる傾向を示した。本実験で用いた特異的阻害剤は貝・蜘蛛が産生するペプチドであり、特異性が高いと言われている。しかし、N-型 Ca^{2+} チャンネル特異的阻害剤は、P/Q-、R-型阻害剤より高濃度を要することから、P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルへの影響を排除できない可能性が示唆された。

海馬神経終末や Calyx of Held シナプス前終末では、N-、P/Q-と R-型 Ca^{2+} チャンネルが神経伝達物質放出に機能する⁷⁻⁹⁾ と報告されており、活性化閾値や不活性化時間等の Ca^{2+} チャンネル機能の違いを示す各 Ca^{2+} チャンネルを使いわけていることが示唆される。P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルは -50 mV 付近から活性化され、N-、R-型 Ca^{2+} チャンネルと比較して活性化が速いことが確認されており⁶⁾、運動神経終末で P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルが主として機能すること¹⁰⁾ を支持する。また、比較的ゆっくり作用する NA を放出する交感神経では、N-型 Ca^{2+} チャンネルが主として機能すること¹¹⁾²⁷⁾ も支持する。 Ca^{2+} チャンネル阻害剤による摘出ラット SCG 神経細胞体で記録され

る Ca^{2+} 電流の抑制効果から、Regan ら²⁵⁾ は、L-型 18%、N-型 85%、P/Q-と R-型 10% と報告しているが、Martinez-Pinna ら²¹⁾ は、L-型 21%、N-型 49%、P/Q-型 11%、R-型 20% が発現していると報告しており、各 Ca^{2+} チャンネルの発現にはばらつきがある。また、摘出ラット SCG 神経細胞体で P/Q-型は発現していないという報告²²⁾²³⁾ と同様に、10-14 日培養 SCG 神経細胞体では、P/Q-型阻害剤の Ca^{2+} 電流抑制効果は認められず、N-型 80%¹⁶⁾¹⁸⁾、L-型 20% と推測されていた¹⁶⁾。本研究では、 Ca^{2+} チャンネル阻害剤によるシナプス後電位 (EPSP 振幅) の減少を指標として、アクティブゾーンでの Ca^{2+} チャンネルの割合を算出した。活動電位によって引き起こされる伝達物質放出を担う Ca^{2+} チャンネルの割合は、N-型 89-94%、P/Q-型 6-10% であることが確認された。R-型阻害剤による EPSP 振幅減少は誤差範囲内であり、伝達物質放出への寄与は明らかでない。また、N-、P/Q-と R-型 Ca^{2+} チャンネル阻害剤によって EPSP が消失したので、0.1 Hz のような低頻度の伝達物質放出への L-型の寄与は否定された。これらの結果は、ラット培養 SCG 神経細胞において細胞体とシナプス前終末の L-型 Ca^{2+} チャンネルの発現と機能に相違があることを示唆する。その例として、細胞体 L-型 Ca^{2+} チャンネルから流入する Ca^{2+} は、核での遺伝子発現を介して蛋白合成促進し²⁸⁾、細胞体 N-型 Ca^{2+} チャンネルが CaMK II を介して L-型 Ca^{2+} チャンネルによる遺伝子発現機能を調節している²⁹⁾。したがって、細胞体での各 Ca^{2+} チャンネルの相互作用は、神経終末のそれと異なった機能を持つことが示唆される。

本研究では、長期培養 10 シナプス中で 4 シナプス (平均培養日数 57 ± 11 日) が ω -agatoxin IVA に感受性を示し、6 シナプス (平均培養日数 55 ± 5.5 日) はまったく感受性を示さないというように、 ω -agatoxin IVA 感受性に神経細胞によるばらつきが認められたが、 ω -agatoxin IVA 感受性を示した 4 シナプスでの ω -agatoxin IVA による ACh 放出抑制は 27% にとどまっていた。交感神経終末は、汗腺を支配する神経を除いて NA を放出するが、培養下でコリン作動性に变化する¹³⁾³⁰⁾。NA を放出する交感神経終末は N-型 Ca^{2+} チャンネルが機能する¹²⁾¹⁴⁾²⁰⁾²⁷⁾ が、ACh を放出する運動神経終末は P/Q-型 Ca^{2+} チャンネルが主として機能する¹⁰⁾ ことを考慮すると、長期培養下で SCG 神経シナプス前終末が伝達物質を

ACh とする fast synapse を形成すれば Ca²⁺ チャネルが N-型から P/Q-型への移行が推測された。しかし、P/Q-型 Ca²⁺ チャネルへの移行が起こらず、神経伝達物質放出に寄与する Ca²⁺ チャネルがほぼ N-型に保持されていることが明らかとなった。これらの結果は、汗腺へのコリン作動性交感神経支配を担う Ca²⁺ チャネルが N-型に保持されている可能性を示唆する。

N-、P/Q-と R-型 Ca²⁺ チャネルが混在する Calyx of Held シナプス前終末では、アクティブゾーンシナプス小胞結合部に P/Q-型、その近傍に N-型 Ca²⁺ チャネルが発現して、シナプス小胞と Ca²⁺ チャネルの配置が神経伝達物質放出に機能的に異なる役割を果たしていると推測されている⁹⁾³¹⁾。一方、N-型 Ca²⁺ チャネルが最もコンダクタンスが高く、アクティブゾーンに存在する Ca²⁺ 結合蛋白質が小胞開口放出に重要であるとの後根神経節細胞での報告もある³²⁾。アクティブゾーン Ca²⁺ チャネルから流入した Ca²⁺ は、Ca²⁺ 親和性に依りて、シナプス小胞膜蛋白質である synaptotagmin³³⁾ や DOC2³⁴⁾ 等の Ca²⁺ 結合蛋白質と結合し、シナプス小胞開口放出過程を前進させる³⁵⁾。近年、Ca²⁺ がシナプス前終末膜からのシナプス小胞膜リサイクリング過程を促進することも明らかとなり¹⁷⁾³⁶⁾、シナプス前終末における Ca²⁺ 濃度動態がシナプス小胞動態を制御することが伺える。長期培養 SCG 神経終末には、Ca²⁺ 低親和性 synaptotagmin I と II が³⁷⁾、また、Ca²⁺ 高親和性 DOC2 発現して ACh 放出を制御する³⁸⁾。P/Q-型 Ca²⁺ チャネルは、synaptotagmin I と結合して伝達物質放出を制御³⁹⁾ するとともに、エンドサイトーシスへの関与が示唆されている⁴⁰⁾ との報告があり、VDCC の発現の違いが Ca²⁺ 結合蛋白質を介したシナプスの機能制御と深くかかわっている可能性が示唆される。N-型 Ca²⁺ チャネルと Ca²⁺ 結合蛋白質の相互作用がどのような生理機能を担うかについての解析は今後の課題とする。

結 論

長期培養 SCG 神経シナプス前終末アクティブゾーン Ca²⁺ チャネルのサブタイプは、N-型が主であり、P/Q-型はすべての SCG 神経シナプス前終末に発現しているのではないが、発現していれば機能する。R-型 Ca²⁺ チャネルは発現していない。以上の結果は、汗腺へのコリン作動性交感神経支配のよ

うに交感神経の伝達物質が NA から ACh に変化しても、神経終末の Ca²⁺ チャネル機能が保持されていることを示唆する。

略 語 一 覧

VDCC : Voltage-dependent Ca channel (電位依存性 Ca²⁺ チャネル)

SCG : Superior cervical ganglion (上頸交感神経節)

EPSP : Excitatory postsynaptic potential (興奮性シナプス後電位)

文 献

- 1) Llinas R, Steinberg IZ, Walton K : Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* **33** : 323-351, 1981
- 2) Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L : Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* **81** : 275-300, 1979
- 3) Catterall WA, Few AP : Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* **59** : 882-901, 2008
- 4) Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA : Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* **57** : 387-395, 2005
- 5) Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP : Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* **11** : 431-438, 1988
- 6) Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA : Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **12** : 349-354, 1991
- 7) Wu LG, Saggau P : Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* **14** : 5613-5622, 1994
- 8) Li L, Bischofberger J, Jonas P : Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* **27** : 13420-13429, 2007
- 9) Wu LG, Westenbroek RE, Borst JG, Catterall WA, Sakmann B : Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci* **19** : 726-736, 1999
- 10) Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD : Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* **121** : 1531-1540, 1997
- 11) Uhrenholt TR, Nedergaard OA : Involvement of dif-

- ferent calcium channels in the depolarization-evoked release of noradrenaline from sympathetic neurones in rabbit carotid artery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97** : 109-114, 2005
- 12) Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW : Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* **239** : 57-61, 1988
 - 13) Landis SC : Target regulation of neuro-transmitter phenotype. *Trends Neurosci* **13** : 344-350, 1990
 - 14) Lin Z, Harris C, Lipscombe D : The molecular identity of Ca channel alpha 1-subunits expressed in rat sympathetic neurons. *J Mol Neurosci* **7** : 257-267, 1996
 - 15) Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA : Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca^{2+} channels. *Neuron* **17** : 781-788, 1996
 - 16) Mochida S, Westenbroek RE, Yokoyama CT, Itoh K, Catterall WA : Subtype-selective reconstitution of synaptic transmission in sympathetic ganglion neurons by expression of exogenous calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : 2813-2818, 2003
 - 17) Ma H, Cai Q, Lu W, Sheng ZH, Mochida S : KIF5B motor adaptor syntabulin maintains synaptic transmission in sympathetic neurons. *J Neurosci* **29** : 13019-13029, 2009
 - 18) Mochida S, Saisu H, Kobayashi H, Abe T : Impairment of syntaxin by botulinum neurotoxin C1 or antibodies inhibits acetylcholine release but not Ca^{2+} channel activity. *Neuroscience* **65** : 905-915, 1995
 - 19) Ma H, Mochida S : A cholinergic model synapse to elucidate protein function at presynaptic terminals. *Neurosci Res* **57** : 491-498, 2007
 - 20) Mochida S, Nonomura Y, Kobayashi H : Analysis of the mechanism for acetylcholine release at the synapse formed between rat sympathetic neurons in culture. *Microsc Res Tech* **29** : 94-102, 1994
 - 21) Martinez-Pinna J, Lamas JA, Gallego R : Calcium current components in intact and dissociated adult mouse sympathetic neurons. *Brain Res* **951** : 227-236, 2002
 - 22) Mintz IM, Adams ME, Bean BP : P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* **9** : 85-95, 1992
 - 23) Zhu Y, Ikeda SR : Adenosine modulates voltage-gated Ca^{2+} channels in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* **70** : 610-620, 1993
 - 24) Lu W, Ma H, Sheng ZH, Mochida S : Dynamin and activity regulate synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. *J Biol Chem* **284** : 1930-1937, 2009
 - 25) Regan LJ, Sah DW, Bean BP : Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons : high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron* **6** : 269-280, 1991
 - 26) Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen Xh, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G : Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroocrates gigas*. *Biochemistry* **37** : 15353-15362, 1998
 - 27) Koh DS, Hille B : Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : 1506-1511, 1997
 - 28) Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW : Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* **20** : 266-273, 2000
 - 29) Wheeler DG, Groth RD, Ma H, Barrett CF, Owen SF, Safa P, Tsien RW : Ca_v1 and Ca_v2 channels engage distinct modes of Ca^{2+} signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell* **149** : 1112-1124, 2012
 - 30) O'Lague PH, Obata K, Claude P, Furshpan EJ, Potter DD : Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71** : 3602-3606, 1974
 - 31) Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, Frotscher M, Jonas P : Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and Ca^{2+} sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* **57** : 536-545, 2008
 - 32) Weber AM, Wong FK, Tufford AR, Schlichter LC, Matveev V, Stanley EF : N-type Ca^{2+} channels carry the largest current : implications for nanodomains and transmitter release. *Nat Neurosci* **13** : 1348-1350, 2010
 - 33) Sudhof TC : The synaptic vesicle cycle : a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375** : 645-653, 1995
 - 34) Orita S, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Igarashi H, Sasaki T, Takai Y : Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca^{2+} -dependent exocytotic machinery. *J Biol Chem* **272** : 16081-16084, 1997
 - 35) Mochida S : Protein-protein interactions in neurotransmitter release. *Neurosci Res* **36** : 175-182, 2000
 - 36) Wu XS, McNeil BD, Xu J, Fan J, Xue L, Melicoff E, Adachi R, Bai L, Wu LG : Ca^{2+} and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nat Neurosci* **12** : 1003-1010, 2009
 - 37) Mochida S, Fukuda M, Niinobe M, Kobayashi H, Mikoshiba K : Roles of synaptotagmin C2 domains in neurotransmitter secretion and inositol high-poly-

- phosphate binding at mammalian cholinergic synapses. *Neuroscience* **77** : 937-943, 1997
- 38) Mochida S, Orita S, Sakaguchi G, Sasaki T, Takai Y: Role of the Doc2 alpha-Munc13-1 interaction in the neurotransmitter release process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 11418-11422, 1998
- 39) Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA : Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* **2** : 939-941, 1999
- 40) Watanabe H, Yamashita T, Saitoh N, Kiyonaka S, Iwamatsu A, Campbell KP, Mori Y, Takahashi T : Involvement of Ca²⁺ channel synprint site in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* **30** : 655-660, 2010

N-type Ca²⁺ channels mediate cholinergic exocytosis in long-term cultured sympathetic neurons

Michinori MORI, Shota TANIFUJI, Masato KONISHI, Sumiko MOCHIDA

Department of Physiology, Tokyo Medical University

Abstract

The firing of action potentials encodes neuronal signals, which activate Ca²⁺ channels expressed at the active zone. Resulting Ca²⁺ entry, initiates release of neurotransmitters from synaptic vesicles. Chemical signals are transmitted to postsynaptic neurons. In central neurons, P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels mediate exocytosis of glutamatergic synaptic vesicles, with a mix expressed at presynaptic terminals. The nerve terminals of motor neurons mediating exocytosis of cholinergic synaptic vesicles express P/Q-type Ca²⁺ channels, while those of sympathetic neurons mediating exocytosis of noradrenergic synaptic vesicles express N-type Ca²⁺ channels. We investigated Ca²⁺ channels mediation of cholinergic synaptic vesicle exocytosis in long-term cultured superior cervical ganglion neuronal terminals. Specific blockers for N-, P/Q-, and R-type Ca²⁺ channels—5 μM ω-conotoxin GVIA, 250 nM ω-agatoxin IVA, and 250 nM SNX-482, respectively—were applied and the resultant decrease in excitatory postsynaptic potential (EPSP) elicited by presynaptic action potential at 0.1 Hz monitored. ω-conotoxin GVIA decreased EPSP amplitude by 94%. In contrast, ω-agatoxin IVA decreased EPSP amplitude by 7% to 10%, while SNX-482 decreased EPSP amplitude by 0.6%. These results suggest that Ca²⁺ channels continue to mediate cholinergic exocytosis in long-term cultured SCG neurons, resulting in maintenance of native function in sympathetic neurons.

〈Key words〉 Presynaptic terminal, Ca²⁺ channels, Neurotransmitter, Exocytosis of synaptic vesicles, Cultured superior cervical ganglion neurons
