

6.

培養交感神経節細胞間シナプスを用いての神経伝達物質放出機構の解析

(生理学第一) 持田澄子, 青柳由貴子,
小林春雄

幼若ラット(生後 7 日)の上頸交感神経節細胞を単離し培養すると、培養 3~4 週間で隣接する細胞の 60-80 % にコリナージック・シナプスが形成されることを電気生理学に検討し、既に報告している。今回、細胞間にシナプスが形成されているかどうかを synaptophysin (シナプス小胞膜に埋めこまれた蛋白)の抗体を用いた免疫蛍光染色法によって確認するとともにシナプス部位を限定し、これまでに、シナプス小胞からの伝達物質放出に関与する生体制御因子として生化学的に単離されている蛋白の局在を synaptophysin の存在部位と比較してこのシナプス終末に存在することを確認した上で、その機能的役割を電気生理学的手法によって解析することを試みた。

1)シナプス終末膜に結合しており、シナプス小胞の docking 蛋白と考えられている syntaxin の抗体を用いてシナプス部位(synaptophysin 抗体で認識される部位)に syntaxin が局在すること、シナプス前細胞に直接導入した syntaxin 抗体が伝達物質放出を阻害することを確認した。

2)筋収縮蛋白として知られているアクチン・ミオシンの抗体はこのシナプス前終末部位にそれらが限局して存在することを示し、シナプス前細胞に導入したミオシン抗体は神経伝達物質の放出を抑制した。更に、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害ペプチドやその特異的阻害剤の導入は伝達物質放出を抑制することを確認した。

このように、細胞体が大きく、シナプス部位までの距離が短いモデル・シナプスを形成させ、そのシナプス前細胞に抗体など分子量の大きな物質を直接導入する方法を用いることによって、今まで困難であったシナプス前終末内でのシナプス伝達制御蛋白の機能解析が可能となった。この実験系を用いて、シナプス伝達障害を伴う神経老化・神経難病の病態理解とその治療法の開発にも寄与し得る。

7.

新生ラット交感神経節前神経細胞における膜電流

(生理学第一) ○宮崎 武文、小林 春雄
登坂 恒夫

交感神経節前神経細胞は上位中枢からの情報を神経節細胞に伝達すると同時に、内臓活動の反射性調節における反射中枢として働いている。したがって、交感神経節前神経細胞における、膜イオン電流の解析は、臨床的にも重要な知見を与えてくれると期待される。今回は上頸部交感神経節の節前神経細胞に存在する膜電流について解析した。

新生ラット脊髄側角は、薄切片中(生後 10 日前後、厚さ約 120 μm)で、他の部分と区別しにくい。しかし、生後約 3 日に上頸部交感神経節に蛍光色素 DiI を注入することで、第一から第三胸髄の側角に、蛍光顕微鏡下で節前神経細胞の細胞体を逆行性に標識することができた。このような細胞を微分干渉顕微鏡下で直視し、ホール・セル記録法により膜イオン電流を測定した。実験は全て室温および 1 μM tetrodotoxin を含む灌流液中で行なった。また保持電圧は -72 mV、通電は矩形波パルスで行なった。記録された電流は Na^+ 、 Ca^{2+} および K^+ 電流であったが、そのうち主に K^+ 電流について解析を行なった。

-60 mV 付近よりも脱分極側で、膜電圧依存的に増大する緩徐外向き電流が観察された。この外向き電流は不活性化する一過性の成分と、不活性化しない持続性の成分の二つの成分から成り立っていた。電流の tail 電流の逆転電位は、 K^+ の平衡電位と一致した。また逆転電位は、外液 K^+ 濃度の変化に対して、Nernst の平衡式から予想される変化を示した。この結果は、この電流が K^+ によるのみ運ばれていることを示している。

30 mM tetraethylammonium chloride (TEA) 存在下で、緩徐外向き K^+ 電流はその大部分が抑制された。また無 Ca^{2+} ・ Co^{2+} 置換液中でも、部分的に抑制された。 Ca^{2+} 依存性の電流にも一過性の成分と持続性の成分の 2 成分が存在した。この電流も -50 mV 付近よりも脱分極側で電圧依存的に増大する外向き整流特性を示した。したがって、緩徐外向き電流は Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流および遅延整流性 K^+ 電流より成り立っていると結論された。

30 mM TEA を含む無 Ca^{2+} ・ Co^{2+} 置換液中において、強い過分極プレパルス電圧からの脱分極通電により、時間経過の遅い一過性の外向き電流が観察された。プレパルス電圧 -132 mV 以上の脱分極通電では、-80 mV 付近よりも脱分極側で、電圧依存的に増大し、調べた範囲(-17 mV まで)では最大に達しなかった。プレパルス電圧を小さくすると、電流は小さくなった。種々のプレパルス電圧から -52 mV への脱分極通電を行い、不活性化曲線を作成した結果、半不活性化電圧は -93 mV であることが判った。この電流は 4-aminopyridine を含む灌流液中で可逆的に抑制された。これらの結果から、この外向き電流は K^+ 電流の一種である A 電流であると結論された。

-90 mV 以上の過分極通電によって、時間経過の非常に遅い膜電圧依存性の内向き電流が観察された。この電流は外液中に Cs^+ を加えることによって可逆的に抑制され、 K^+ 電流の他の一種である Q 電流であると結論された。

現在これらの電流に対する種々の神経伝達物質の作用を検討中である。