

博士論文

論文題目 シナプス前終末における電位依存性
カルシウムチャネルの微細配置

氏 名 金原 直也

シナプス前終末における電位依存性カルシウムチャネルの
微細配置

東京大学大学院医学系研究科
医学博士課程脳神経医学専攻

指導教員 廣瀬 謙造 教授

金原 直也

【目次】

目次	2
要旨	3
序論	4
方法	10
結果	28
考察	40
参考文献	52
図	65
謝辞	82

要旨

シナプス小胞の開口放出は電位依存性カルシウムチャネルより流入したカルシウム依存的に生じるが、シナプス小胞の放出部位と電位依存性カルシウムチャネルの位置関係はわかっていない。本研究では電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を、超解像顕微鏡技術を用いて解析した。電位依存性カルシウムチャネルはシナプス小胞の放出部位から数十 nm 程度の近傍において、6 分子程度から構成されるクラスターを形成していることを明らかにした。ナノメートルオーダーで制御された電位依存性カルシウムチャネルの空間配置はシナプス小胞の開口放出の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

序論

シナプスは脳における情報処理の最も基本的な素子として機能している¹⁻³。シナプスでは、シナプス前終末から放出された神経伝達物質がシナプス後部にて受容されることで情報の伝達が行われる⁴。シナプス前終末には活動電位依存的に電位依存性カルシウムチャネルが開くことで、カルシウムが流入する。流入したカルシウムはシナプス小胞の開口放出を引き起こし、シナプス小胞に充填された神経伝達物質が放出される^{4,5}。シナプス前終末には数百個のシナプス小胞が存在しているが、そのうち数%程度はアクティブゾーンと呼ばれる細胞膜近傍の限局した領域に配置されており、活動電位に応じて即時放出可能な状態にあると考えられている^{6,7}。即時放出可能なシナプス小胞が形成されている場所はシナプス小胞の放出部位と呼ばれている。シナプス小胞は、シナプス小胞の膜上に存在する VAMP2 と細胞膜上に存在する syntaxin-1 及び SNAP25 が SNARE 複合体を形成することで即時放出可能な状態になっている^{8,9}。

電位依存性カルシウムチャネルは α サブユニット（190 kDa）、 β サブユニット（55 kDa）と $\alpha_2\delta$ サブユニット（170 kDa）から構成されている分子複合体である¹⁰。電位依存性カルシウムチャネルはシナプス前終末において活動電位依存的なカルシウムの流入源としてシナプス小胞の開口放出に重要な役割を果た

している¹¹。電位依存性カルシウムチャネルは活動電位依存的に開口すると、開口部周辺に急峻なカルシウム濃度勾配を形成する¹²。シナプス小胞が開口放出を行う確率は、カルシウム濃度の 4 ~ 5 乗に比例することが知られているため^{13,14}、シナプス小胞の開口放出の確率はシナプス小胞の放出部位と電位依存性カルシウムチャネルの間の距離に強く依存すると考えられている。例えば電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位が 20 nm 離れている場合と 60 nm 離れている場合では開口放出の確率は 10 倍程度異なると見積もられている¹⁵。従って、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の距離はシナプス小胞の開口放出を制御する重要な因子であると考えられてきた¹⁶。

これまで電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係は、電気生理学的実験と計算機実験を組み合わせた研究によって推定されてきた。これらの研究の多くは、カルシウムキレーターをシナプス前終末に導入した際にシナプス小胞の開口放出がどの程度抑制されるかを電気生理学的手法にて測定し、測定結果を説明できる電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を、反応拡散系のシミュレーションによる検証を介して推定している¹⁷⁻¹⁹。脳幹に存在する Calyx of Held と呼ばれる巨大シナプスにおいては計算機実験を用いた研究が多くなされており、アクティブゾーン内においてクラスター化した 10 分子程度の電位依存性カルシウムチャネルがシ

ナプス小胞の放出部位に依存せずランダムに配置しているモデルや¹⁷、シナプス小胞の放出部位の周囲 30 nm から電位依存性カルシウムチャネルが排除されているというモデル¹⁸が提唱されてきた。また、海馬の苔状線維と CA3 錐体細胞間のシナプスにおいてはシナプス小胞の放出部位から 70 nm 程度の距離に電位依存性カルシウムチャネルが配置しているとするモデルが提唱されている¹⁹。しかしながら、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の実際の位置関係は明らかになっていない。

電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を明らかにするためには、実際に顕微鏡等を用いて両者を可視化し、位置関係を解析する必要がある。近年、標本の膜構造を観察する手法である凍結切断レプリカ法と免疫電子顕微鏡を組み合わせた手法（凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡法）を用いてアクティブゾーンでの電位依存性カルシウムチャネルの空間配置についての解析がなされ、電位依存性カルシウムチャネルはアクティブゾーンにおいて 50 - 100 nm 程度の直径のクラスターを形成することが明らかとなった^{20,21}。しかしながら、凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡ではシナプス小胞の放出部位の同定は達成されておらず、クラスター化した電位依存性カルシウムチャネルがシナプス小胞の放出部位に対し、どのような位置関係で配置されているかは未だに明らかになっていない。

シナプス小胞の放出部位を同定するためには、シナプス小胞の放出部位に存在する分子を標識する方法が有効である。シナプス小胞の放出部位に存在する分子としては **Munc13-1** が挙げられる。**SNARE** 複合体の構成タンパク質である **syntaxin-1** は、**Munc13-1** と結合していない状態では、自己抑制により **SNARE** 複合体を形成することができないが、**Munc13-1** との結合により自己抑制が解除されることで **SNARE** 複合体を形成することが知られている^{22,23}。**Munc13-1** のノックアウトマウスの海馬の神経細胞では即時放出可能なシナプス小胞が消失することから^{24,25}、**Munc13-1** による **syntaxin-1** の自己抑制の解除は即時放出可能なシナプス小胞の形成に必要不可欠であると考えられている。そのため、**Munc13-1** はシナプス小胞の放出部位に配置することで、**syntaxin-1** の自己抑制の解除を介し、即時放出可能なシナプス小胞の形成を担っていると考えられている⁸。

電位依存性カルシウムチャネルと **Munc13-1** を同一シナプスにて観察することができれば、アクティブゾーンにおける電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を解析することが可能である。しかしながら、従来の光学顕微鏡技術では、光の回折限界によって規定される解像度の限界により²⁶、数百 nm 程度の大きさであるアクティブゾーン内において分子がどのように配置しているかを解析することは不可能であった。この問題を解決す

る技術として、近年開発された超解像顕微鏡技術が有効である²⁷。超解像顕微鏡技術のひとつである **STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM 顕微鏡)** は 10 nm 程度の優れた解像度を有し、シナプスにおける分子の空間配置の解析にも用いられている技術である²⁸⁻³⁰。**STORM 顕微鏡**では、視野内に存在する蛍光色素のうちごく一部のみを、個々の蛍光色素の輝点が空間的に重ならないように、確率的に蛍光を発することができる状態（オン状態）にし、オン状態の蛍光色素の位置座標を輝点の中心座標より求めるという作業を数千回繰り返す。この作業により、対象とする分子の位置座標を網羅的に取得し、最終的に対象とする分子の分布を示す画像（**STORM 像**）を取得した対象分子の位置座標より再構築する²⁸。

本研究では、**STORM 顕微鏡**を用いて解析を行うことで、アクティブゾーンにおける電位依存性カルシウムチャンネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を明らかにすることを目的とした。まず **STORM 顕微鏡**を用いて解析することで、単一のアクティブゾーンの中で電位依存性カルシウムチャンネルが複数のクラスターを形成して存在していることを明らかにした。クラスターは 6 分子程度の電位依存性カルシウムチャンネルより構成されていた。クラスターの配置には一定の規則性があり、アクティブゾーンの端には少ないことやクラスター同士が重ならず配置していることを明らかにした。また、**STORM 顕微鏡**を用い

た電位依存性カルシウムチャネルと Munc13-1 の位置関係の解析により、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはシナプス小胞の放出部位から数十 nm 程度の近傍に配置していることを明らかにした。

方法

海馬神経細胞の培養

妊娠 21 日目の Sprague-Dawley ラットをジエチルエーテルで麻酔し、胎児を取り出した後、直ちに胎児の脳から海馬を取り出した。取り出した海馬をトリプシン (Invitrogen) と DNase I (Sigma) で消化し、神経細胞を分離した。神経細胞は単層グリア細胞上で 2% B-27 サプリメント (Invitrogen)、0.25% glutamax (Gibco)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (Nacalai Tesque)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Wako) を含む Neurobasal-A 培地 (Invitrogen) 中で培養した。培養開始 1 日後に cytosine arabinoside (Sigma Aldrich) を終濃度 2 μ M とするように加えた。その後、5~7 日毎に培地を半量交換した。23~31 日間培養した後、実験に用いた。細胞は二酸化炭素濃度 5%, 37°C で培養した。動物の取り扱い、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従っており、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会より承認されている (承認番号：医-P14-058)。

293T 細胞の培養

293T 細胞は 10% ウシ血清アルブミン (SIGMA) を含むダルベッコ変法イ

ーグル培地（Wako）で培養した。細胞は二酸化炭素濃度 5%、37℃で培養した。

Cacnb4-EGFP 発現プラスミドの作製

pLenti6PW TGB（京都大学金子武嗣教授より供与）を XhoI で切断し、attB2 サイトを切り出し、続いて EcoRV と SalI で切断した後に Klenow Fragment で末端を平滑化することで attB1 サイトを切り出した（pLenti6PW TGB attB (-)）。ccdB をコードしている cDNA フラグメントを ccdB-F と ccdB-R のプライマーペアを用いた PCR により MGC クローンライブラリーより増幅し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した。精製した cDNA フラグメントを MluI と EcoRV で切断し、pLenti6PW TGB attB(-)の MluI/EcoRV サイトに挿入した（pLenti6PW ccdB）。アニールさせた 2 種類のオリゴヌクレオチド（MPSB と cMPSB）を pLenti6PW ccdB の BsrGI と MluI サイトに挿入した（pLenti6PW MPSB）。電位依存性カルシウムチャネル β 4 サブユニット（Cacnb4）をラット cDNA ライブラリーより二段階の PCR によって増幅し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した。また、EGFP を pLenti6PW TGB をテンプレートとして EGFP-F と EGFP-R のプライマーペアを用いた PCR によって増幅し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した。pLenti6PW MPSB の SalI/PmeI サイトに、SpeI、SalI で切断した Cacnb4 の cDNA

フラグメントと SalI と PmeI で切断した EGFP の cDNA フラグメントを挿入した (pLenti6PW Cacnb4-EGFP)。用いたプライマーとオリゴヌクレオチドの配列を以下に記す。

ccdB-F 5'-GGGGATATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAACG-3'

ccdB-R 5'-GGGACGCGTACCACTTTGTACAAGAAAGCTGAACG-3'

MPSB 5'-CGCGTCAGTTTAAACTGACTAGTCGT-3'

cMPSB 5'-GTACACGACTAGTCAGTTTAAACTGA-3'

EGFP-F 5'-TATAGTCGACTGGCGGCAGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

EGFP-R 5'-TATAGTTTAAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

また、Cacnb4 の cDNA の増幅に用いたプライマーを記す。

1 段階目フォワードプライマー

5'-AGCGCAGTTCTTCCAGAGAG-3'

1 段階目リバースプライマー

5'-CAGCAGATACTGTGCCATGC-3'

2 段階目フォワードプライマー

5'-TATAACTAGTATGTATGACAATTTGTACCTGCATGG-3'

2 段階目リバースプライマー

5'-TATAGTTTAAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

全ての遺伝子組換え実験は東京大学遺伝子組換え実験規則に則り、行っており、東京大学大学院医学系研究科遺伝子組換え生物等委員会より承認されている（承認番号：77-2）。

レンチウイルスの作製と神経細胞への感染

10 cm シャーレ (Nunc) に播種した 293T 細胞に 9.6 μ g の psPAX2 (Addgene)、4.8 μ g の pMD2.G (Agilent) と 9.6 μ g の pLenti6PW Cacnb4-EGFP または pLenti6PW STB（京都大学金子武嗣教授より供与）を X-tremeGENE（Roche）を用いて導入した。24 時間後に培地を交換し、更に 24 時間後にウイルス粒子を含む培地を回収した。ウイルスを含む培地は 9000 g で 18 時間の遠心分離によって 10 倍に濃縮した。18- 22 日培養後の海馬神経細胞にウイルス液を加えることで Cacnb4-EGFP を発現させた。

神経細胞の免疫染色

培養海馬神経細胞を氷冷した 1% パラホルムアルデヒドと 4% スクロースを含む PBS（137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 9.58 mM NaHPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, すべて Nacalai Tesque）にて氷上で 15 分間固定を行った後に、氷冷した 0.25% の Triton-X を含む PBS にて氷上で 5 分間処理することで細胞膜の透水性を上げた。その

後、氷上で冷やした 0.3 %の BSA を含む PBS (0.3% BSA-PBS) によって氷上で 15 分間ブロッキング処理をした後に、一次抗体を含む BSA-PBS と室温で 1 時間反応させた。0.3% BSA-PBS で洗浄し、一次抗体を除いた後に、蛍光色素で標識した二次抗体を含む 0.3% BSA-PBS と室温で 30 分間反応させた。反応後、0.3% BSA-PBS で洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒドと 4%スクロースを含む PBS を加え、室温で 15 分間固定し、以下の実験に供した。

抗体

用いた一次抗体は、抗 Cav2.1 抗体 (Synaptic Systems, #152 203, 1/800, 抗原: アミノ酸残基 1921 - 2212 番目または Synaptic Systems, #152 205, 1/200, 抗原: アミノ酸残基 1921 - 2212 番目)、抗 Bassoon 抗体 (Enzo Life sciences, SAP7F407, 1/400, 抗原: アミノ酸残基 738 - 1035 番目)、抗 GFP 抗体 (Wako, mFX73, 1/800)、抗 Munc13-1 抗体 (11B-10G, 0.5 μ g / ml)、抗 PSD-95 抗体 (Merk Millipore, MAB1598, 1/1000) である。抗 Cav2.1 抗体は別途記載していない限り #152 203 を用いた。抗 Munc13-1 抗体 (11B-10G) は Munc13-1 の 1-320 番目のアミノ酸に His タグを融合したリコンビナントタンパク質を抗原として作製されたマウスモノクローナル抗体である。Alexa Fluor 647 で標識した抗 Cav2.1 モノクローナル抗体は、抗 Cav2.1 抗体 (Synaptic Systems, #152 211, 抗原: アミノ酸残基 1921 - 2212 番目)

を Alexa Fluor Fluor 647 NHS ester (Molecular Probes) との反応で蛍光標識し、抗体の終濃度 3 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。

二次抗体は全て NHS 化した Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) あるいは DyLight 755 (Thermo Scientific)との反応によって未標識の二次抗体を標識することで調製した。未標識の二次抗体は Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (111-005-144, Jackson ImmunoResearch)、Goat Anti-Mouse IgG(H+L) (111-005-146, Jackson ImmunoResearch)、Goat Anti-Mouse IgG(H+L) Fc γ subclass 2a Specific (115-005-206, Jackson ImmunoResearch)、Donkey Anti-Guinea Pig IgG(H+L) (706-005-148, Jackson ImmunoResearch)である。

全ての抗体の使用時の希釈率は免疫染色した際に、最大の染色強度が得られるように最適化した。

神経細胞における蛍光グルタミン酸イメージング

蛍光グルタミン酸イメージングは先行研究に従い行った³¹。蛍光グルタミン酸プローブ eEOS を BoNT/C-Hc を介し、神経細胞に標識した後、細胞外液を HEPES 緩衝生理食塩水 (25 mM HEPES, 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 25 mM D-glucose, 10 mM L-ascorbic acid, 3 mM myo-inositol、2 mM sodium pyruvate, 100 μM GYKI52466, 50 μM D-AP5, 200 nM SYM2081, 0.5 mM 4-aminopyridine, pH

7.4) に置換し、蛍光顕微鏡にてイメージングを行った。プラチナ平行電極にて 50 Hz にて 20 回刺激を行い、有意な蛍光の上昇が見られたシナプスを、グルタミン酸を放出するシナプスと定義した。グルタミン酸イメージング終了後直ちに標本を固定し、Bassoon を免疫染色した。

蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡画像は、油浸対物レンズ（100 倍, NA 1.40, Olympus）、キセノンアークランプを備えた倒立顕微鏡（IX-71, Olympus）と EM-CCD カメラ（iXon EM+, Andor）を用いて取得した。ただし、蛍光グルタミン酸イメージングの際には光源として LED 照明（LCS-BC25-0495, Mightex）を用いた。Alexa Fluor 488 由来の蛍光画像を取得する際、及び蛍光グルタミン酸イメージングの際は 460-480 nm の励起光フィルター、485 nm のダイクロイックミラーと 495-540 nm の吸収フィルターから構成される U-MGFPHQ フィルターセット（Olympus）を用いた。Alexa Fluor 555 由来の蛍光画像を取得する際は 535-555 nm の励起光フィルター、565 nm のダイクロイックミラーと 570-625 nm の吸収フィルターから構成される U-MRFPHQ フィルターセット（Olympus）を用いた。Alexa Fluor 647 由来の蛍光画像を取得する際は 608-648 nm の励起光フィルター、660 nm のダイクロイックミラーと 672-712 nm の吸収フィルターから構成される Cy5-4040C フィルターセ

ット (Semrock) を用いた。

3D-STORM 顕微鏡のセットアップ

3D-STORM イメージングには油浸対物レンズ (100 倍, NA 1.40, Olympus)、EMCCD カメラ (iXon3 860, Andor)、ピエゾコントローラー (PI)、シリンドリカルレンズにて自作した顕微鏡を用いた。Alexa Fluor 647 は、640 nm レーザー (OBIS, Coherent) を標本面にて約 5 kW/cm^2 で照射することで励起した。Alexa Fluor 647 の蛍光はペンタバンドダイクロイックミラー (FF408/504/581/667/762-Di01-25x36, Semrock) と 670-750 nm の吸収フィルター (710QM80, Omega) を通した後に EMCCD カメラで検出した。DyLight 755 は、670-745 nm の励起光フィルター (FF01-708/75-25, Semrock) を通した 745 nm の超短パルスレーザー (Chameleon, Coherent) を、標本面にて約 1 kW/cm^2 で照射することで励起した。DyLight 755 の蛍光はペンタバンドダイクロイックミラーと 770-850 nm の吸収フィルター (FF02-809/81-25, Semrock) を通した後に検出した。蛍光を発しない状態になった Alexa Fluor 647 や DyLight 755 は 405 nm レーザー (OBIS, Coherent) を標本面にて $0.1 \sim 40 \text{ W/cm}^2$ で照射することによって蛍光を発する状態へ活性化させた³²。Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 で標識した分子の 3D-STORM イメージングでは、405 nm レーザーを標本面にて $0.02 \sim 16 \text{ W/cm}^2$ で照射し、Alexa Fluor 405 を

励起することで、蛍光を発しない状態の Alexa Fluor 647 を、蛍光を発する状態へ活性化させた。また、Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 で標識した分子の 3D-STORM イメージングでは、488 nm レーザー(OBIS coherent) を標本面にて $0.005 \sim 4 \text{ W/cm}^2$ で照射し、Alexa Fluor 488 を励起することで、蛍光を発しない状態の Alexa Fluor 647 を、蛍光を発する状態へ活性化させた²⁸。

3D-STORM イメージング

Cacnb4-EGFP の 3D-STORM イメージングにおいては Alexa Fluor 647 標識二次抗体にて Cacnb4-EGFP を免疫染色した標本を用いた。また、Cav2.1 と Bassoon の 3D-STORM イメージングでは、Alexa Fluor 647 標識二次抗体及び DyLight 755 標識二次抗体にて Cav2.1 と Bassoon をそれぞれ免疫染色した標本を用いた。まず、標本に位置補正用マーカーとして蛍光ビーズ (F8810, Life Technologies) を貼り付け、標本の外液を dSTORM バッファー (50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 60% sucrose, 10% glucose, 0.1% β -mercaptoethanol, 0.5 mg/ml glucose oxidase, 0.04 mg/ml catalase, pH8.0) に置換した。その後、標本をカバーガラス (15 mm, Thickness no.1, 0.12 ~ 0.17 mm, Matsunami Glass) で挟み、マニキュアを用いて密閉した。3D-STORM イメージングでは、Alexa Fluor 647 の蛍光を 16 msec / frame で 50,000 ~ 100,000 画像測定した後に、DyLight 755 の蛍光を 50 msec / frame

にて 20,000 ~ 50,000 画像測定した。

Munc13-1 と Cav2.1 の 3D-STORM イメージングでは、Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 標識二次抗体及び Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 標識二次抗体にて Munc13-1 と Cav2.1 をそれぞれ免疫染色した標本を用いた。また、Cav2.1 と Cacnb4-EGFP の STORM イメージングでは、Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 標識二次抗体及び Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 標識二次抗体にて Cav2.1 と Cacnb4-EGFP をそれぞれ免疫染色した標本を用いた。3D-STORM イメージングの際には、Alexa Fluor 647 の蛍光の明滅を Alexa Fluor 405 あるいは Alexa Fluor 488 を励起することで制御した²⁸。まず、位置補正用マーカーとして蛍光ビーズを標本に貼り付け、標本の外液を STORM バッファー（50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 60% sucrose, 10% glucose, 1% β -mercaptoethanol, 0.5 mg/ml glucose oxidase, 0.04 mg/ml catalase, pH8.0）に置換した。その後、標本をカバーガラスで挟み、マニキュアを用いて密閉した。3D-STORM イメージングでは、Alexa Fluor 488 を励起しながら Alexa Fluor 647 の蛍光を 16 msec / frame で 5,000 画像測定した後、Alexa Fluor 405 を励起しながら Alexa Fluor 647 の蛍光をフレームレート 16 ミリ秒で 5,000 画像測定するというサイクルを 11 サイクル測定した。ただし、1 サイクル目は解析に用いなかった。

3D-STORM 像の再構築

3D-STORM イメージングによって取得した画像は 1 ピクセル分のサイズ (192 nm) を標準偏差とする二次元空間ガウシアンフィルターで処理した後、自作の ImageJ のプラグインを用いて解析した。プラグインでは取得画像の蛍光スポットに二次元ガウス関数を適合させ、最小二乗法で最適解を算出することで蛍光スポットの中心点 (位置座標) を求めた。蛍光色素の z 座標は蛍光スポットに適合させた二次元ガウス関数の x 軸方向の半径と y 軸方向の半径の比 (縦横比) を、予め蛍光ビーズを用いて作製した縦横比と z 座標の対応表に当てはめることで求めた³³。3D-STORM イメージング中の標本のドリフトは標本上に配置した位置補正用マーカーの位置座標を基準にして補正した。また、Alexa Fluor 647 と DyLight 755 を用いた 3D-STORM イメージングの際の色収差は、予め蛍光ビーズを用いて作製した画像内の座標と色収差の対応表を用いて、補正した³⁴。

求めた蛍光色素の位置座標の集合は 10 nm の解像度で画像として再構築した。再構築した画像のピクセル値は、そのピクセルに対応する座標領域に含まれる位置座標の数とした。再構築画像は 10 nm の標準偏差の三次元空間ガウシアンフィルターで処理した。

3D-STORM 像の解析

3D-STORM イメージングでの取得全画像のうち、前半の画像から取得した位置座標より再構築した画像と後半の画像から取得した位置座標より再構築した画像を比較することで、取得した 3D-STORM 像の再現性を確認した。アクティブゾーンにおける分子の空間配置を解析する際には、対象とするアクティブゾーンに由来する全位置座標を、全位置座標の重心を原点に回転させた後に xy 平面へ投射することで、アクティブゾーン平面での 2 次元位置座標へ変換した。座標変換した 2 次元位置座標は 10 nm 解像度で画像に再構築し、10 nm の空間ガウシアンフィルターで処理した。クラスタリングと Pair Correlation Function 解析 (PCF 解析) はアクティブゾーン平面へ投射した 2 次元位置座標を用いて行った。

Cav2.1 の 3D-STORM 像及び Munc13-1 の 3D-STORM 像はウォード法を評価関数とする凝集型の階層的クラスタリングにて個々のクラスターに分割した。クラスターの直径は、分割したクラスター中の全位置座標の x 座標の標準偏差と y 座標の標準偏差の平均より求めた半値全幅 (Full Width at half maximum, FWHM) にて評価した。クラスター間距離は中心間距離にて評価した。

PCF 解析は分子間の位置関係の規則性を解析する手法であり、一方の分子から距離 r での他方の分子の密度を表す値 $g(r)$ を算出する。ある距離におい

て、両分子が無関係に配置している場合には $g(r)=1$ となり、多く存在している場合には $g(r) > 1$ となる。対象とする 2 種類の分子 A と B の PCF 解析は以下の定義式に基づいて行った³⁵。

$$g(r) = \frac{K'(r)}{2\pi r} \quad (1)$$

ただし、 $K'(r)$ は $K(r)$ の微分関数である。

$$K(r) = \kappa_i(r)/\lambda^2 \quad (2)$$

$$\lambda^2 = n_1 n_2 / v(W)^2 \quad (3)$$

n_1, n_2 はそれぞれ、分子 A の位置座標の総数と分子 B の位置座標の総数を表し、 $v(x)$ は集合 x の面積を表す。また、 W は解析対象の領域を示す。ただし、同一分子での PCF 解析では $\lambda^2 = n(n-1)/v(W)^2$ となる。

$$\kappa_i(r) = \sum_{x_1, x_2 \in W} \frac{\mathbf{1}(0 < \|x_1 - x_2\| \leq r) \omega(x_1, x_2)}{v(W(\|x_1 - x_2\|))} \quad (4)$$

x_1 は分子 A の位置座標、 x_2 は分子 B の位置座標、 $\mathbf{1}(x)$ は x を満たす場合は 1、それ以外の場合は 0 となる。 $\omega(x_1, x_2) = 2\pi/\alpha(x_1, x_2)$ であり、 $\alpha(x_1, x_2)$ は x_1 を中心とし、半径を $\|x_1 - x_2\|$ とする円における、 W に含まれる円弧の角度の和である。 $W^{(r)} = \{x \in W : \partial(b(x, r)) \cap W \neq \emptyset\}$ であり、 $\partial(b(x, r))$ は x を中心とし、半径を r とする円の円周を表す。以上の解析は Mathematica 10.2 (Wolfram Research) にて行った。

2 色の 3D-STORM イメージングにおけるクロストークの推定

Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 色素ペアで標識した分子と Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 で標識した分子の 2 色の 3D-STORM 顕微鏡測定の際には、両分子の 3D-STORM 像の間でクロストークが生じる²⁹。クロストークの程度は、Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 色素ペアのみで標識した標本あるいは Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 色素ペアのみで標識した標本を 2 色の 3D-STORM イメージングすることで解析し、以下の式の関係にあることが推定された。

$$n_{405} = N_{405} + 0.11 \times N_{488} \quad (5)$$

$$n_{488} = N_{488} + 0.08 \times N_{405} \quad (6)$$

ただし、 n_{405} , n_{488} はそれぞれ、3D-STORM イメージングで取得された Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 色素ペアあるいは Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 色素ペアの位置座標の数であり、 N_{405} , N_{488} はそれぞれ、クロストークがない場合に 3D-STORM イメージングで取得される、Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 405 色素ペアあるいは Alexa Fluor 647-Alexa Fluor 488 色素ペアの位置座標の数である。

PCF 解析におけるクロストークの補正は以下の方法で行った。標的分子 A のアクティブゾーン平面での全位置座標のリストを X_A とし、もう一方の標的分子 B のアクティブゾーン平面での全位置座標のリストを X_B とする。 X_A と X_B を PCF 解析に供し、 $g(r)$ を求めた ($g(r)_{raw}$)。続いて分子 B がアクティブゾーン

内でランダムに配置すると仮定した時の位置座標のリスト ($\mathbf{X}_{B, \text{rand}}$) をシミュレーションにて作成した。 \mathbf{X}_A をランダムに 9:1 に分割し (\mathbf{X}_{A+} , \mathbf{X}_{A-})、また $\mathbf{X}_{B, \text{rand}}$ もランダムに 9:1 に分割した ($\mathbf{X}_{B, \text{rand}+}$, $\mathbf{X}_{B, \text{rand}-}$)。 \mathbf{X}_{A+} と $\mathbf{X}_{B, \text{rand}-}$ を結合した位置座標のリスト ($\mathbf{X}_{A, \text{cros}}$) はランダムに配置した分子 B のクロストークを含んだ分子 A の位置座標のリストであり、 $\mathbf{X}_{B, \text{rand}+}$ と \mathbf{X}_{A-} を結合した位置座標のリスト ($\mathbf{X}_{B, \text{cros}}$) は分子 A のクロストークを含んだランダムに配置した分子 B の位置座標のリストである。ランダムに配置した分子 B は分子 A に対し、無関係に配置しているため、 $\mathbf{X}_{A, \text{cros}}$ と $\mathbf{X}_{B, \text{cros}}$ を PCF 解析に供することで求めた $g(r)$ ($g_{\text{cros}}(r)$) について、全ての r で $g_{\text{cros}}(r) \doteq 1$ となるように補正を行う。19 回作成した $\mathbf{X}_{B, \text{rand}}$ それぞれについて $g_{\text{cros}}(r)$ を求め、平均値 $\overline{g_{\text{cros}}}(r)$ を求めた。クロストークを補正した $g(r)_{\text{raw}}$ ($g_c(r)_{\text{raw}}$) は以下の式より求めた。

$$g_c(r)_{\text{raw}} = g(r)_{\text{raw}} / \overline{g_{\text{cros}}}(r) \quad (7)$$

本文中ではクロストークを補正した $g(r)$ は $g_c(r)$ として表記した。

Cav2.1 の分子数の推定

アクティブゾーンにおける Cav2.1 の平均分子数 (N_{syn}) は以下の式より推定した。

$$N_{\text{syn}} = F_{\text{syn}} / (F_{\text{ab}} \times R_{\text{cell/glass}}) \quad (8)$$

F_{syn} はアクティブゾーンにおける Cav2.1 を Alexa Fluor 647 で標識した抗 Cav2.1 モノクローナル抗体 (Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb) にて標識した際の、シナプスの蛍光強度である。 F_{ab} はカバーガラス上での Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 分子の蛍光強度である。 $R_{cell/glass}$ は溶媒の屈折率により生じる、カバーガラス上と神経細胞上での Alexa Fluor 647 の蛍光強度の違いである。 F_{syn} は以下の方法で求めた。Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 及び抗 Bassoon 抗体を用いて、神経細胞を免疫染色した。免疫染色した標本の細胞外液を測定用バッファー (50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 60% sucrose, 10% glucose, pH8.0) に置換し、Bassoon の染色より同定したシナプスにおける Alexa Fluor 647 の蛍光強度を蛍光顕微鏡で測定し、平均蛍光強度 F_{syn} を求めた。

F_{ab} は以下の方法で求めた。Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb を変性バッファー (20 mM リン酸緩衝液, 6M グアニジン塩酸塩, pH7.6) にて室温で 10 分間処理した。コラーゲンと poly-L-Lysin にてコートしたカバーガラス (25 mm×25 mm, Thickness no.1, 0.12 ~ 0.17 mm, Matsunami Glass) を 1% NaBH₄ を含む PBS と室温で 30 分間反応させた後に、変性バッファーで処理した Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb を加え、室温で 10 分間反応させた。その後、PBS にて 2 回洗い、測定用バッファーに置換した。蛍光顕微鏡にて Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 由来の Alexa Fluor 647 の蛍光スポットを測定し、平均蛍光強度 F_{ab} を求めた。 $R_{cell/glass}$ は $F_{647,cell}$

$/F_{647}$ より求めた。 F_{647} はカバーガラス上での Alexa Fluor 647 一分子の蛍光強度であり、 $F_{647,cell}$ は細胞上での Alexa Fluor 647 一分子の蛍光強度である。

F_{647} 及び $F_{647,cell}$ は以下の方法により求めた。コラーゲンと poly-L-Lysin にてコートしたカバーガラスを 1% NaBH₄ を含む PBS と室温で 30 分間反応させた後に、PBS で希釈した 1 nM Alexa Fluor 647 NHS ester を加え、室温で 10 分間反応させた。その後、PBS にて 2 回洗い、測定用バッファーに置換した。蛍光顕微鏡にて Alexa Fluor 647 の蛍光スポットの蛍光強度を測定し、平均蛍光強度 F_{647} を求めた。また、海馬分散培養標本の細胞上においても同様の方法で Alexa Fluor 647 の平均蛍光強度 $F_{647,cell}$ を求めた。

Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb の蛍光強度測定の際の蛍光スポットに存在する Alexa Fluor 647 分子の数 ($N_{647/spot}$) は以下の式より推定した。

$$N_{647/spot} = F_{ab} / (F_{647} \times R_{ab/free}) \quad (9)$$

$R_{ab/free}$ は抗体への標識による Alexa Fluor 647 の蛍光強度の減少率であり、以下の方法で求めた。0.2 % BSA-PBS に Alexa Fluor 647 の終濃度が 10 nM となるように Alexa Fluor 647 NHS ester あるいは Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb を加え、分光蛍光光度計 (FP-6500, 日本分光株式会社) を用いて 650 nm の波長で励起した際の 668 nm の蛍光強度を測定し、Alexa Fluor 647 NHS ester あるいは Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb の蛍光強度を求めた。求めた蛍光強度の比から $R_{ab/free}$ を算出し

た。

一分子の抗 Cav2.1 モノクローナル抗体に標識された Alexa Fluor 647 の平均分子数は、Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 溶液中の IgG と Alexa Fluor 647 の濃度比より推定した。IgG と Alexa Fluor 647 の濃度は、分光光度計 (v-550, 日本分光株式会社) を用いて測定した Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 溶液の 280 nm 及び 650 nm の吸光度と、マウスの IgG のモル吸光係数 ($200,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 280 nm) 及び Alexa Fluor 647 のモル吸光係数 ($270,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 650 nm) より推定した。

顕微鏡による測定は 3D-STORM 顕微鏡のセットアップにて行った。ただし、Alexa Fluor 647 は、640 nm レーザーを標本面にて 10 W/cm^2 で照射することで励起した。蛍光強度はレーザーの照射開始から 1 秒間の蛍光強度により評価した。

結果

電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の超解像顕微鏡を用いた解析

アクティブゾーンにおける電位依存性カルシウムチャネルの空間配置を明らかにするために、免疫染色した電位依存性カルシウムチャネルの観察を行った。海馬分散培養神経細胞において、電位依存性カルシウムチャネルの α サブユニットである Cav2.1 とアクティブゾーンのマーカーである Bassoon を、それぞれ抗 Cav2.1 抗体と抗 Bassoon 抗体を用いて蛍光色素にて標識した。染色した標本を従来の蛍光顕微鏡にて観察したところ、Bassoon の粒状の染色が観察された (図 1 中央)。Bassoon の粒状の染色はアクティブゾーンを示すと考えられる。

Bassoon の染色により決定したシナプス前終末のうち、80%はグルタミン酸を放出することが蛍光グルタミン酸イメージング³¹によって確認され、また 88%がシナプス後部を有することが PSD-95 の免疫染色より確認された。Cav2.1 の従来の蛍光顕微鏡像においても粒状の染色が観察された (図 1 左)。Cav2.1 の粒状の染色は Bassoon の粒状の染色と一致することから、アクティブゾーンに存在する Cav2.1 を観察していることが示された。

従来の蛍光顕微鏡の空間分解能の理論限界は 200 nm 程度であり、数百 nm 程度の大きさのアクティブゾーン内で Cav2.1 がどのように配置しているかとい

う点までは解析することができない。そこで、標識した Bassoon と Cav2.1 を約 10 nm の空間分解能を持つ STORM 顕微鏡を用いて観察した。STORM イメージングでは、シリンドリカルレンズを導入し、非点収差を解析することで標的分子の三次元位置座標を決定し、三次元 STORM 像（3D-STORM 像）を再構築した³³（図 2）。

取得した 3D-STORM 像を観察面に投影した画像において、Cav2.1 と Bassoon の重なりがアクティブゾーン毎に異なっていた（図 3A, B）。アクティブゾーンは観察面に対し様々な向きをとっていると考えられるので、Cav2.1 と Bassoon の重なりの違いは、アクティブゾーンを様々な方向から観察した結果生じたものであると推測される。そこで、アクティブゾーンにおける 3D-STORM 像を回転させ、アクティブゾーンを横から見た画像（図 3C 上, アクティブゾーンの側面像）とアクティブゾーンを正面から見た画像（図 3C 下, アクティブゾーンの正面像）を作成した（図 3D）。観察したほぼ全てのアクティブゾーンでは、アクティブゾーンの側面像において Bassoon と Cav2.1 は 50-100 nm 程度離れていた（図 3C 上）。今回用いた抗 Bassoon 抗体と同じ領域を抗原として作製された抗 Bassoon 抗体を用いた場合には、アクティブゾーンにおいて細胞膜より 70 nm 程度離れた場所が染色されることが、免疫電子顕微鏡による観察から示されており³⁶、今回の結果は過去の報告と矛盾しない。アクティブゾーン

の正面像では Bassoon が配置している領域において Cav2.1 は分離された複数のスポット状に配置していた (図 3C 下)。この結果は、Cav2.1 がアクティブゾーンにおいて複数のクラスターを形成していることを示している。

STORM 顕微鏡において、本来の分子配置を反映していない STORM 像がアーチファクトとして観察されてしまう可能性が報告されている³⁷。アーチファクトの原因の 1 つとしては、撮影した蛍光色素の数が少なすぎることで、本来均一に配置している蛍光色素が一部のみに存在しているように観察されることが挙げられる³⁸。また、STORM 顕微鏡では蛍光色素の確率的な明滅を測定しているが、まれに同一の蛍光色素が短時間に何度も明滅を繰り返すことがある。短時間での同一の蛍光色素の繰り返した明滅 (蛍光色素のバースティング) を STORM 顕微鏡で測定すると、本来標本中には存在しない見かけ上のクラスターが観察されてしまう³⁹。本研究で観察された Cav2.1 のクラスターが以上のようなアーチファクトに因るものでないことを確認するために、3D-STORM 像の再現性試験を行った。具体的には STORM 顕微鏡測定で撮像した全ての蛍光画像のうち、前半の蛍光画像より決定した蛍光色素の位置座標から再構築した画像 (前半の画像) と後半の蛍光画像より決定した蛍光色素の位置座標から再構築した画像 (後半の画像) で同じ場所に Cav2.1 のクラスターが観察されるか解析した。一部の蛍光色素のみを測定したことで Cav2.1 のクラスターが観察された

のであれば、前半の画像と後半の画像で異なる場所にクラスターが観察されるはずであり、蛍光色素のバースティングによって見かけ上のクラスターが作り出されたのであれば **STORM** 顕微鏡測定の前半と後半において同じ場所で蛍光色素のバースティングが生じ、その結果同じ場所でクラスターが観察される可能性は十分低いと考えられる³⁹。**Cav2.1** の **3D-STORM** 顕微鏡測定の前半の画像と後半の画像を比較したところ、両方で同じ場所にクラスターが観察された (図 4)。また、前半の画像と後半の画像の各ピクセルの強度は強く相関しており ($r = 0.77 \pm 0.02$, $n = 12$ 視野)、**Cav2.1** の **3D-STORM** 顕微鏡測定の前半と後半で再現性のある **3D-STORM** 像が得られていることが示された。よって、**3D-STORM** 顕微鏡にて観察された **Cav2.1** のクラスターは **3D-STORM** イメージングによって生じた見かけ上のクラスターではなく、**Cav2.1** の真の空間配置を表している。

異なる抗 **Cav2.1** 抗体 (#152 205) を用いた場合でも **Cav2.1** のクラスターが観察されるか否かを検証した。抗 **Cav2.1** 抗体 (#152 205) を用いて神経細胞を免疫染色し、従来の蛍光顕微鏡にて観察したところ、**Cav2.1** と **Bassoon** の共局在が観察された (図 5A 左)。更に、**3D-STORM** 顕微鏡を用いて観察したところ (図 5A 右)、アクティブゾーンにおける **Cav2.1** のクラスター化した配置が示された (図 5B)。

カルシウムチャネル $\beta 4$ サブユニットの 3D-STORM 顕微鏡を用いた解析

ここまでの実験より、電位依存性カルシウムチャネルの α サブユニットである Cav2.1 がクラスターを形成することを明らかにした。電位依存性カルシウムチャネルは α サブユニット, β サブユニット, $\alpha 2\delta$ サブユニットの複合体である¹⁰。そこで α サブユニット以外のサブユニットもクラスターを形成するか否か検証した。シナプス前終末において発現していることが知られている電位依存性カルシウムチャネルの $\beta 4$ サブユニット (Cacnb4)⁴⁰ に EGFP を融合したタンパク質 (Cacnb4-EGFP) を神経細胞に発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色した。また、アクティブゾーンのマーカーとして Munc13-1 を免疫染色した⁴¹。従来の蛍光顕微鏡にて観察したところ、Munc13-1 の粒状の染色によって確認されたアクティブゾーンにおいて、Cacnb4-EGFP が局在していた (図 6A)。アクティブゾーンにおける Cacnb4-EGFP の粒状の染色を 3D-STORM 顕微鏡にて観察したところ、Cacnb4-EGFP がクラスターを形成していることが明らかとなり (図 6B)、Cav2.1 と同様に、Cacnb4 がアクティブゾーンにおいてクラスターを形成することが示された。

続いて、Cav2.1 と Cacnb4 の位置関係に着目し解析を行った。Cacnb4-EGFP を発現させた神経細胞を、抗 Cav2.1 抗体と抗 GFP 抗体を用いて免疫染色し、3D-STORM 顕微鏡にて観察したところ (図 7A)、Cav2.1 と Cacnb4-EGFP の共局

在が観察された（図 7B）。Cav2.1 と Cacnb4-EGFP の位置関係を、PCF 解析を用いて定量的に評価したところ⁴²、50 nm 以内の距離において $g_c(r) > 1$ であり、距離が近づくほど $g_c(r)$ は大きくなった（図 7C）。この結果は、Cav2.1 の近傍において Cacnb4-EGFP が配置していることを示している。

電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの定量的解析

Cav2.1 のクラスターについて数、大きさ、クラスター間の距離を解析した。まず階層的クラスタリングを用いることで Cav2.1 のアクティブゾーンの正面像を複数の Cav2.1 のクラスターに分割した（図 8）。分割された Cav2.1 のクラスターの直径は 60 nm（中央値, $n = 207$ クラスター, 図 9A）、最近傍クラスター間距離は 95 nm（中央値, $n = 207$ クラスター, 図 9B）であった。また、クラスターの数、ひとつのアクティブゾーン当たり 6.9 ± 4.6 個（ $n = 30$ アクティブゾーン）であった。アクティブゾーン全体に分布していることが知られている Bassoon^{36,43} の 3D-STORM 像をもとに、アクティブゾーンの面積を定量したところ（ $0.15 \pm 0.11 \mu\text{m}^2$ 、 $n = 30$ アクティブゾーン）、アクティブゾーンの面積と Cav2.1 のクラスターの数の間には強い相関が見られ（ $r = 0.83$, $p = 1.4 \times 10^{-9}$, $n = 30$ アクティブゾーン）、 $1 \mu\text{m}^2$ 当たり 43 個のクラスターが存在することが明らかになった（図 9C）。

続いて Cav2.1 のクラスターがアクティブゾーン内でどのように配置しているかを解析した。まず、Cav2.1 のクラスターがアクティブゾーンの端に多いか、それとも中心付近に多いかという点に着目して解析を行った。その結果、Bassoon の 3D-STORM 像をもとに推定したアクティブゾーンの縁から 50 nm 以内の距離に配置されている Cav2.1 のクラスターは全体の 24% ($n = 30$ アクティブゾーン、207 クラスター) であり、クラスターがアクティブゾーン内にランダムに配置していると仮定した時 (中央値 46%, 95%信頼区間 40 ~ 50%) と比べ少ないことが示された (図 10A, B)。この結果より電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはアクティブゾーンの端には少ないことが明らかとなった。

クラスターがアクティブゾーン内においてランダムに配置しているのか、あるいは何らかの規則性を持って配置しているかという点を明らかにするために、PCF 解析を用いてアクティブゾーンにおける Cav2.1 の分子間の位置関係を解析し、 $g(r)$ を求めた ($g_{Cav2.1}(r)$) (図 10C 黒実線)。また、クラスターがアクティブゾーン内においてランダムに配置していると仮定した時のデータをシミュレーションにて作成し、PCF 解析にて $g(r)$ を求めた ($g_{sim}(r)$) (図 10C マゼンタ細線)。19 回のシミュレーションデータの $g_{sim}(r)$ の平均値 ($\overline{g_{sim}}(r)$) (図 10C マゼンタ太線) と $g_{Cav2.1}(r)$ を比較したところ、90 nm 以内の距離においては $g_{Cav2.1}(r) / \overline{g_{sim}}(r) < 1$ であり、185 nm から 270 nm においては $g_{Cav2.1}(r) / \overline{g_{sim}}(r) > 1$ となっ

た(図 10D)。この結果は、各々の Cav2.1 のクラスターから 90 nm 以内の距離においては他の Cav2.1 のクラスターの存在確率が低いこと、及び各々の Cav2.1 のクラスターから 200 nm 程度離れた場所において他の Cav2.1 クラスターの存在確率が高いことを示している。以上より、Cav2.1 のクラスターはアクティブゾーン内においてランダムに配置しているのではなく、クラスター間の距離を保って規則的に配置していることが明らかとなった。

クラスターにおける Cav2.1 の分子数の推定

本研究で観察された Cav2.1 のクラスターが、何分子の Cav2.1 から形成されているか推定した。Cav2.1 の分子数は Alexa Fluor 647 で標識した抗 Cav2.1 モノクローナル抗体 (Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb) を用いて免疫染色することで推定した。まず、Alexa Fluor 647 一分子の蛍光強度の測定をした。Alexa Fluor 647 をガラス上に十分薄い密度で散布し、蛍光顕微鏡にて蛍光スポットの蛍光強度を測定したところ、平均蛍光強度は $1,710 \pm 736$ photons / sec であった (図 11A)。観察した蛍光スポットは 1 ステップで退色したことから、Alexa Fluor 647 一分子の蛍光の測定であることが示された (図 11B)。続いて、Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb も同様に、ガラス上に十分薄い密度で散布し、蛍光顕微鏡にて蛍光スポットの蛍光強度を測定したところ、平均蛍光強度は $4,276 \pm$

3,293 photons / sec であった (図 11C)。Alexa Fluor 647 は抗体に標識されることで蛍光強度が 70%まで減少するため、蛍光顕微鏡にて測定した Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb の蛍光スポットには、平均で $(4,276 / (1,710 \times 70\%)) = 3.6$ 個の Alexa Fluor 647 が存在していると推定された。この値は分光光度計による測定から推定した Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 一抗体あたりの Alexa Fluor 647 の結合数 (3.8 個) と一致しており、測定した Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb の蛍光スポットは Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb 一分子由来の蛍光であると考えても矛盾はない。

Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb を用いて神経細胞を免疫染色し、それぞれのシナプスにおける蛍光強度を測定した。その結果、平均蛍光強度は $146,618 \pm 90,000$ photons / sec であった (図 11D)。測定溶媒の屈折率により、神経細胞上ではガラス上に比べ、Alexa Fluor 647 の蛍光強度は 83%まで低下する。よって、アクティブゾーンにおける Cav2.1 の平均分子数は $(146,618 / (4,276 \times 83\%)) = 41$ 分子と推定された。1つのアクティブゾーンには平均で 7 個の Cav2.1 のクラスターが存在するため、単一の Cav2.1 のクラスターは 6 分子程度の Cav2.1 により構成されていると推定された。

電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係の超解像顕微鏡を用いた解析

Munc13-1 はシナプス小胞の開口放出に必要な不可欠な分子であり、シナプス小胞の放出部位に配置していると考えられている⁸。ここでは、Cav2.1 と Munc13-1 の位置関係に着目することで、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の位置関係を解析した。Cav2.1 と Munc13-1 を抗 Cav2.1 抗体と抗 Munc13-1 抗体を用いて蛍光色素にて標識し、3D-STORM 顕微鏡にて観察した所、Cav2.1 と Munc13-1 の共局在が観察された (図 12A)。

Munc13-1 と Cav2.1 が共局在しているアクティブゾーンにおいて、両分子の位置関係を解析するために Cav2.1 の 3D-STORM 像と Munc13-1 の 3D-STORM 像を回転させ、アクティブゾーンの正面像と側面像を作製した (図 12B)。アクティブゾーンの側面像においては Cav2.1 と Munc13-1 はほぼ同じ位置に配置していた (図 12B 上段)。Munc13-1 はアクティブゾーンの細胞膜近傍に配置していることが知られているため⁴³、膜タンパク質である電位依存性カルシウムチャネルと同一平面上に存在しているという今回の結果は過去の知見と一致する。また、アクティブゾーンの正面像においては、Munc13-1 と Cav2.1 それぞれがクラスターを形成していた (図 12B 下段)。また、多くの Cav2.1 のクラスターは Munc13-1 のクラスターと重なって配置しているか、あるいは近接して配置して

いた。PCF 解析を用いて、アクティブゾーンにおける Cav2.1 と Munc13-1 の位置関係を解析したところ、45 nm 以内の距離において $g_c(r)$ は 1.1 ~ 1.3 であり、Cav2.1 は Munc13-1 から 45 nm 以内に多く配置していた (図 13)。

続いて、Cav2.1 のクラスターと Munc13-1 のクラスターに着目して解析を行った。Munc13-1 のクラスター数と Cav2.1 のクラスター数の関係を解析したところ、各々のアクティブゾーンにおける Cav2.1 のクラスターの数と Munc13-1 のクラスターの数の間には強い相関が見られ (傾き = 0.95, $r = 0.71$, $p = 1.5 \times 10^{-5}$, $n = 29$ アクティブゾーン) (図 14A)、一つのシナプス小胞の放出部位に対し、一個程度の電位依存性カルシウムチャネルのクラスターが存在することが明らかとなった。

アクティブゾーンに存在する Cav2.1 のクラスターから最も近接して配置している Munc13-1 のクラスターまでの距離を解析したところ、43 nm (中央値, $n = 29$ アクティブゾーン, 133 クラスター) であり (図 14B)、Cav2.1 のクラスターがアクティブゾーンにランダムに配置していると仮定したときの Cav2.1 のクラスターと最近傍の Munc13-1 のクラスターの距離 (46 ~ 56 nm, 95 % 信頼区間, 図 14B) よりも近かった。更に、Cav2.1 のクラスターから最近傍の Munc13-1 のクラスターまでの距離の分布を、累積度数分布にて評価したところ、10 nm から 50 nm の距離においてのみ、Cav2.1 のクラスターがアクティブゾーン内にラン

ダムに配置していると仮定したときの 95 %信頼区間から上に外れていた (図 14C)。この結果から、半分程度の電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはシナプス小胞の放出部位の近傍に配置していることが示された。

考察

本研究では、3D-STORM 顕微鏡を用いることで電位依存性カルシウムチャネルのアクティブゾーンにおける空間配置を解析した（図 15）。その結果、海馬分散培養神経細胞のアクティブゾーンにおいて、電位依存性カルシウムチャネルは複数のクラスターを形成していることが示された。電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはシナプス小胞の放出部位から数十 nm 程度の近傍に配置していることが明らかとなった。

超解像顕微鏡を用いた電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の解析により 解明された事及び今後の課題

従来の研究において、電位依存性カルシウムチャネルの空間配置は凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡を用いることで解析されてきた^{20,21}。凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡は、炭素の蒸着により保持した細胞の膜成分を、抗体を用いて標識し、電子顕微鏡で観察する手法であり、膜タンパク質を観察する手法として非常に有効である⁴⁴。細胞の膜成分は炭素の蒸着により固定されているものの、炭素の蒸着後に SDS で標本を処理するため、アクティブゾーンに局在するタンパク質を始めとする細胞質のタンパク質が標本に保持されている保証はな

い。そのため、凍結割断レプリカ免疫電子顕微鏡を用いた研究では電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の解析はなされているものの、電位依存性カルシウムチャネルとアクティブゾーンに局在するタンパク質との位置関係の解析は困難であった。**STORM** 顕微鏡は、免疫染色した標本を用いるため、過去の研究で蓄積されてきた免疫染色についての数多の知見を活用することができ、膜タンパク質に限らず、細胞内外のあらゆるタンパク質を観察可能である^{29,30}。そこで本研究では、**STORM** 顕微鏡を用いることで電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位に配置する **Munc13-1** の位置関係を明らかにした。

本研究では、パラホルムアルデヒドにて化学固定した標本を、抗体を用いて染色した。いくつかの膜タンパク質は、パラホルムアルデヒドによって十分に固定されず、固定処理の後も膜上を移動することが知られており⁴⁵、電位依存性カルシウムチャネルも固定処理後に膜上を移動している可能性がある。この場合、2つの抗原結合部位を持つ抗体によって架橋されることで、本来存在しない電位依存性カルシウムチャネルのクラスターが形成されてしまうかもしれない。電位依存性カルシウムチャネルのクラスターは凍結割断レプリカ電子顕微鏡法でも観察されている^{20,21}。この手法では、抗体による電位依存性カルシウムチャネルの染色の前に、電位依存性カルシウムチャネルを含む細胞膜構造を炭素の蒸着により保持するため、抗体の架橋によるクラスターの形成は生じないと考

えられる。そのため、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターは必ずしも抗体の架橋によるアーチファクトではないと考えられる。超解像顕微鏡技術は生きた細胞へも応用可能な技術である^{38,46,47}。生きた神経細胞において、蛍光タンパク質を融合することなどで可視化した電位依存性カルシウムチャネルを超解像顕微鏡にて観察することで、外的な操作の最小限な条件においても電位依存性カルシウムチャネルがクラスターを形成するか否かを明らかにすることは、今後の重要な課題である。更に、生きた神経細胞における電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の解析は、電位依存性カルシウムチャネルの空間配置が経時的に変化するか否か、あるいは過去の活動依存的に可塑的に変化するか否かといった新しい課題へも応用可能な手法であると考ええる。

電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの解析において考えられる誤差

電位依存性カルシウムチャネルは 60 nm 程度の大きさのクラスターを形成しており、クラスター同士は一定の間隔をあけて配置していることを示した。しかし、実際には観察されたクラスターより小さいクラスターがアクティブゾーン内にランダムに配置しており、本研究では複数個の重なった電位依存性カルシウムチャネルのクラスターを 1 つのクラスターとして解析している可能性がある。本研究で解析された電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの大

きさは、ヒストグラムにて表すと単一の鋭いピークを持つ分布となっており（図 9A）、クラスターの大きさは比較的均一であった。小さいクラスターが乱雑に重なって形成されたクラスターが、均一な大きさとなるとは考えにくい。実際に、観察された Cav2.1 のクラスターの大きさの下限值である 40 nm の大きさのクラスターを、シミュレーションにてアクティブゾーン内にランダムに配置したところ、ほぼ全てのシミュレーション結果において大きさの不均一なクラスターが形成され、均一な大きさのクラスターが形成されることは稀であった。よって小さいクラスターがアクティブゾーン内にランダムに配置することで、本研究で観察された Cav2.1 の空間配置が達成されている可能性は低いと考えられる。

電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの大きさは直径にて約 60 nm であると推定した。電位依存性カルシウムチャネルは一次抗体と二次抗体を用いて染色している。抗体一分子の大きさは約 10 nm であるため、抗体の大きさの影響により本研究ではクラスターの大きさを過大に見積もっている可能性がある。また、STORM 顕微鏡の解像度は約 10 nm であり、クラスターの大きさの推定に少なからず影響を与えている。よって本研究による電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの大きさの推定値は実際のクラスターの大きさの上限値であると考えられる。例えば実際の電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの大きさが 40 nm である仮定すると、電位依存性カルシウムチャネルの

大きさは直径約 10 nm であるため^{48,49}、クラスター中の 38%程度が電位依存性カルシウムチャネルで専有されている計算となる。抗体として約 5 nm の大きさである nanobody や F(ab')₂ フラグメントを用いることで⁵⁰、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターの大きさのより正確な推定が期待される。

電位依存性カルシウムチャネルのクラスターには 6 分子程度の Cav2.1 が配置していると推定した。しかし、用いた抗 Cav2.1 抗体のエピトープが他の分子により遮蔽されるなどの原因により、抗 Cav2.1 抗体が全ての Cav2.1 に結合できない可能性がある。また、抗体は 2 つの抗原結合部位を持つため、1 分子の抗 Cav2.1 抗体が 2 分子の Cav2.1 と結合する可能性がある。以上の理由により、本研究より推定した、1 つのクラスター当たりの Cav2.1 の分子数は、実際のクラスター当たりの分子数の下限値であると考えられる。また、電位依存性カルシウムチャネルは直径約 10 nm と大きいため、排除体積効果によりクラスター中に存在できる電位依存性カルシウムチャネルの数は必然的に制限される。クラスターの直径が 40 nm であると仮定した場合、クラスター中の Cav2.1 の分子数の上限値は 16 分子程度であると計算される。電気生理学的実験より海馬歯状回の顆粒状細胞のシナプス前終末には、アクティブゾーン当たり平均で 44 分子の Cav2.1 が存在していると推定されており⁵¹、本研究で推定されたアクティブゾーン当たりの Cav2.1 の平均分子数である 42 分子と概ね一致する。以上より、本

研究で推定されたクラスター当たりの Cav2.1 の分子数は先行研究と矛盾しない。

電位依存性カルシウムチャネルの空間配置を制御する分子基盤

電位依存性カルシウムチャネルは CAST/ELKS, RBP, Rim1 といったアクティブゾーンに局在するタンパク質と結合することが知られている⁵²⁻⁵⁵。これらのタンパク質はいずれも、PDZ ドメインや SH3 ドメインといったタンパク質間結合に関与するドメインを複数有している^{56,57}。そのため、これらの分子は電位依存性カルシウムチャネルを含む分子複合体を局所的に形成することで、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターを形成している可能性がある。

CAST/ELKS, RBP, Rim1 のいずれのノックアウトマウスの神経細胞においてもシナプス小胞の開口放出の確率が減少することからも⁵⁸⁻⁶⁰、これらの分子が電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の制御に重要な役割を果たしていることが示唆される。更に、Rim1 や RBP は、Munc13-1 と直接あるいは間接的に結合することから^{61,62}、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位を近付ける役割を担っていると考えられている。実際に RBP のノックアウトマウスの Calyx of Held では、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の距離が離れている可能性が示されている⁵⁹。また、電位依存性カルシウムチャネルとの結合が報告されていないタンパク質によっても、電位依存性カル

シウムチャネルの空間配置は制御されている可能性がある。繊維状のタンパク質である Septin5 は未成熟な Calyx of Held においてシナプス小胞の放出部位周辺に繊維状の構造体を形成する。繊維状の構造体は電位依存性カルシウムチャネルがシナプス小胞の放出部位に近づくことを防ぐ障壁として機能していると提唱されている⁶³。Septin5 と Rim1 や RBP の競合的な作用の結果、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の距離が決定されていることが示唆される。

電位依存性カルシウムチャネルの空間配置が CAST/ELKS, RBP, Rim1 や septin5 といった分子によってどのように制御されているかを明らかにする上で、反応拡散モデルに基づいたシミュレーションによる解析は有効な手法のひとつである。例えば、反応拡散モデルをベースとしたシミュレーションは、シナプス後部におけるグリシン受容体のクラスターの形成メカニズムの解析に用いられており⁶⁴、グリシン受容体と足場タンパク質 gephyrin の結合と双方の分子の拡散のみで、グリシン受容体のクラスター形成を説明可能であることが示されている⁶⁵。電位依存性カルシウムチャネルについても、細胞膜上での拡散係数や CAST/ELKS, RBP や Rim1 との結合定数等の分子動態パラメーターを実験により求め、求めたパラメーターを基に反応拡散モデルでのシミュレーションを行うことで、クラスター形成に必要な十分な最小の分子構成を明らかにすることがで

きる可能性がある。また、シミュレーションを用いた実験は、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターと Munc13-1 のクラスターの近接した位置関係を実現する分子メカニズムの解析へも応用可能であると考ええる。

カルシウムチャネルの空間配置のシナプス機能への役割

本研究ではシナプス小胞の放出部位から 43 nm 程度の距離にて電位依存性カルシウムチャネルが約 6 分子から形成されるクラスターを形成していることを明らかにした。電位依存性カルシウムチャネルは活動電位に応じて 25 %程度の確率で開口することが知られている⁶⁶。6 分子から形成されたクラスターでは活動電位に応じていずれかの電位依存性カルシウムチャネルが開く確率は 80%程度である。そのため、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターは活動電位に応じて安定してカルシウムを流入させる場として機能していると考えられる。シナプス小胞の放出部位から 40 nm 程度の距離に存在する電位依存性カルシウムチャネルより流入したカルシウムがシナプス小胞の開口放出を引き起こす確率は 20%以下であると見積もられており^{67,68}、多くの神経細胞の低いシナプス小胞の放出確率と矛盾しない^{19,69}。連続した活動電位が生じると、クラスター化した電位依存性カルシウムチャネルより毎回カルシウムが流入するため、シナプス小胞の放出部位周辺にはカルシウムが蓄積する。そこへ更に流入する

カルシウムが加算されるため、連続した活動電位に対してはシナプス小胞の開口放出の確率が増大することが予想される⁷⁰。実際に中枢神経系の多くの興奮性シナプスは、連続した活動電位に対してシナプス伝達の効率を増加させる短期増強の性質を有することが知られており^{19,71}、シナプス伝達における短期増強の性質は本研究で明らかとなった電位依存性カルシウムチャネルの空間配置によって十分説明され得る。

一部の電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはシナプス小胞の放出部位には近接せずに配置していた（図 14C）。これらの電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはカルシウム依存性が報告されているシナプス小胞の再取り込みに関与している可能性がある⁷²。実際に、電位依存性カルシウムチャネルは AP2、clathrin HC、dynamin2 や intersectin といったシナプス小胞の再取り込みを担っているタンパク質との結合が示されている⁷³。本研究はシナプス小胞の開口放出とシナプス小胞の再取り込みが電位依存性カルシウムチャネルの異なるクラスターによって独立に制御されている可能性を示唆する。

また、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターがアクティブゾーンのエンドで少なく、中心付近に多く配置していることを明らかにした（図 10A）。アクティブゾーンにおいて、シナプス小胞の開口放出はアクティブゾーンの中心寄りの場所において行われていることが知られている⁷⁴。シナプス小胞の開口

放出や放出可能なシナプス小胞の形成はカルシウム濃度に強く依存する^{13,14,75}。

そのため、電位依存性カルシウムチャネルがアクティブゾーンを中心寄りの場所に多く存在することで、シナプス小胞の開口放出が生じる場所がアクティブゾーンを中心付近に限定されている可能性がある。

シナプス伝達効率の不均一性への電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の寄与

活動電位に応じたシナプス伝達の動態は脳の領域、あるいは投射もとの神経細胞や投射先の神経細胞の種類によって異なることが知られている⁷⁶⁻⁷⁸。海馬苔状線維と CA3 錐体細胞間の興奮性シナプスを始めとする多くのシナプスは、一回一回の活動電位に対するシナプス伝達効率は低いものの、連続した活動電位に対して短期増強の性質を示すことが知られている¹⁹。一方で、海馬歯状回のバスケット細胞と顆粒状細胞間の抑制性シナプスなどは、一回一回の活動電位に応じて高い効率、かつ高い時間精度でシナプス伝達を行う性質を持つことが知られている¹⁵。シナプス伝達における短期増強の性質は既に考察した通り、電位依存性カルシウムチャネルのアクティブゾーンにおける空間配置で説明することができるが、活動電位に応じて高い効率、かつ高い時間精度でシナプス伝達を行う性質もシナプス小胞の放出部位から 10 nm 程度の極めて近い位置に配

置した電位依存性カルシウムチャネルにより説明可能であることが示されている¹⁵。そのため、脳の領域あるいは投射もとや投射先の神経細胞の種類によるシナプス伝達の性質の違いは、電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の違いによって生み出されている可能性が示唆されてきた¹⁶。本研究によりアクティブゾーンにおける電位依存性カルシウムチャネルの空間配置を高空間分解能で解析する方法論が確立されたことで、脳の領域あるいは投射もとや投射先の神経細胞の種類によって実際に電位依存性カルシウムチャネルの空間配置が異なるか否かを検証可能である。

シナプス前終末から活動電位に応じて神経伝達物質が放出される確率は同一軸索上のシナプス前終末でも大きく異なることが知られているが^{31,79}、シナプス間で神経伝達物質の放出確率が不均一であることの分子基盤は多く不明である。電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位間の距離は神経伝達物質の放出確率を決定する要因の1つである⁶⁸。そのため、シナプス間での神経伝達物質の放出確率の不均一性は、電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位の距離の違いによって生み出されている可能性がある。蛍光カルシウムプローブ等を用いて神経伝達物質の放出確率を決定したシナプスで、**STORM** 顕微鏡を用いて電位依存性カルシウムチャネルとシナプス小胞の放出部位との距離を解析することで、電位依存性カルシウムチャネルとシナプ

ス小胞の放出部位の距離が、神経伝達物質の放出確率のシナプス間での違いに
寄与しているか否かについて今後検証することが可能である。

参考文献

1. Abbott, L. F. & Regehr, W. G. Synaptic computation. *Nature* **431**, 796–803 (2004).
2. Abbott, L. F., Varela, J. A., Sen, K. & Nelson, S. B. Synaptic depression and cortical gain control. *Science* **275**, 220–224 (1997).
3. Mongillo, G., Barak, O. & Tsodyks, M. Synaptic theory of working memory. *Science* **319**, 1543–1546 (2008).
4. del Castillo, J. & Katz, B. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* **124**, 560–573 (1954).
5. Klein, R. *Neurotransmitter Vesicles*. (Academic Pr, 1982).
6. Zhai, R. G. & Bellen, H. J. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiol. Bethesda Md* **19**, 262–270 (2004).
7. Südhof, T. C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**, 675–690 (2013).
8. Jahn, R. & Fasshauer, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207 (2012).
9. Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J.E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.

- Nature* **362**, 318–324 (1993).
10. Catterall, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
 11. Catterall, W. A. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* **24**, 307–323 (1998).
 12. Llinás, R., Sugimori, M. & Silver, R. B. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256**, 677–679 (1992).
 13. Lou, X., Scheuss, V. & Schneggenburger, R. Allosteric modulation of the presynaptic Ca^{2+} sensor for vesicle fusion. *Nature* **435**, 497–501 (2005).
 14. Sun, J., Pang, Z.P., Qin, D., Fahim, A.T., Adachi, R. & Südhof, T.C. A dual- Ca^{2+} -sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* **450**, 676–682 (2007).
 15. 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).
 16. Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S. P. & Jonas, P. Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 7–21 (2012).

17. Meinrenken, C. J., Borst, J. G. G. & Sakmann, B. Calcium secretion coupling at calyx of Held governed by nonuniform channel-vesicle topography. *J. Neurosci.* **22**, 1648–1667 (2002).
18. Keller, D., Babai, N., Kochubey, O., Han, Y., Markram, H., Schürmann, F. & Schneggenburger, R. An Exclusion Zone for Ca^{2+} Channels around Docked Vesicles Explains Release Control by Multiple Channels at a CNS Synapse. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004253 (2015).
19. Vyleta, N. P. & Jonas, P. Loose coupling between Ca^{2+} channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* **343**, 665–670 (2014).
20. Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M. & Nusser, Z. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* **15**, 988–997 (2012).
21. Nakamura, Y., Harada, H., Kamasawa, N., Matsui, K., Rothman, J.S., Shigemoto, R., Silver, R.A., DiGregorio, D.A. & Takahashi, T. Nanoscale distribution of presynaptic Ca^{2+} channels and its impact on vesicular release during development. *Neuron* **85**, 145–158 (2015).
22. Ma, C., Li, W., Xu, Y. & Rizo, J. Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 542–

- 549 (2011).
23. Yang, X., Wang, S., Sheng, Y., Zhang, M., Zou, W., Wu, L., Kang, L., Rizo, J., Zhang, R., Xu, T. & Ma, C. Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 547–554 (2015).
24. Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C. & Brose, N. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* **400**, 457–461 (1999).
25. Imig, C., Min, S.-W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Südhof, T.C., Rhee, J., Brose, N. & Cooper, B.H. The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* **84**, 416–431 (2014).
26. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **9**, 413–418 (1873).
27. Huang, B., Bates, M. & Zhuang, X. Super resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 993–1016 (2009).
28. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–795 (2006).
29. Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C. & Zhuang, X. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron* **68**, 843–856 (2010).
30. Dudok, B., Barna, L., Ledri, M., Szabó, S.I., Szabadits, E., Pintér, B., Woodhams,

- S.G., Henstridge, C.M., Balla, G.Y., Nyilas, R., Varga, C., Lee, S.H., Matolcsi, M., Cervenak, J., Kacs Kovics, I., Watanabe, M., Sagheddu, C., Melis, M., Pistis, M., Soltesz, I. & Katona, I. R. Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* **18**, 75–86 (2015).
31. Takikawa, K., Asanuma, D., Namiki, S., Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N. & Hirose, K. High-throughput development of a hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 13439–13443 (2014).
32. Heilemann, M., van de Linde, S., Schütt pelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P. & Sauer, M. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **47**, 6172–6176 (2008).
33. Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* **319**, 810–813 (2008).
34. Baddeley, D., Crossman, D., Rossberger, S., Cheyne, J.E., Montgomery, J.M., Jayasinghe, I.D., Cremer, C., Cannell, M.B. & Soeller, C. 4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues. *PloS One* **6**, e20645 (2011).

35. Illian, D. J., Penttinen, P. A., Stoyan, D. H. & Stoyan, D. *Statistical Analysis and Modelling of Spatial Point Patterns*. (John Wiley & Sons, 2008).
36. Sanmartí-Vila, L., tom Dieck, S., Richter, K., Altmann, W., Zhang, L., Volkhardt, W., Zimmermann, H., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. & Dresbach, T. Membrane association of presynaptic cytomatrix protein bassoon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 43–46 (2000).
37. Kamiyama, D. & Huang, B. Development in the STORM. *Dev. Cell* **23**, 1103–1110 (2012).
38. Kiuchi, T., Higuchi, M., Takamura, A., Maruoka, M. & Watanabe, N. Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes. *Nat. Methods* **12**, 743–746 (2015).
39. Annibale, P., Vanni, S., Scarselli, M., Rothlisberger, U. & Radenovic, A. Identification of clustering artifacts in photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* **8**, 527–528 (2011).
40. Xie, M., Li, X., Han, J., Vogt, D.L., Wittemann, S., Mark, M.D. & Herlitze, S. Facilitation versus depression in cultured hippocampal neurons determined by targeting of Ca²⁺ channel Cavβ4 versus Cavβ2 subunits to synaptic terminals. *J. Cell Biol.* **178**, 489–502 (2007).

41. Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Südhof, T.C., Rettig, J. & Brose, N. Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* **21**, 123–136 (1998).
42. Coltharp, C., Yang, X. & Xiao, J. Quantitative analysis of single-molecule superresolution images. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **28**, 112–121 (2014).
43. Limbach, C., Laue, M.M., Wang, X., Hu, B., Thiede, N., Hultqvist, G. & Kilimann, M.W. Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, E392–401 (2011).
44. Fujimoto, K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* **108**, 3443–3449 (1995).
45. Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S.H., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K. & Kusumi, A. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nat. Methods* **7**, 865–866 (2010).
46. Westphal, V., Rizzoli, S.O., Lauterbach, M.A., Kamin, D., Jahn, R. & Hell, S.W.

- Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* **320**, 246–249 (2008).
47. Jones, S. A., Shim, S.-H., He, J. & Zhuang, X. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat. Methods* **8**, 499–508 (2011).
48. Wang, M.-C., Collins, R.F., Ford, R.C., Berrow, N.S., Dolphin, A.C. & Kitmitto, A. The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif. *J. Biol. Chem.* **279**, 7159–7168 (2004).
49. Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C. & Kitmitto, A. Three-dimensional structure of CaV3.1: comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture. *J. Biol. Chem.* **284**, 22310–22321 (2009).
50. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
51. 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).
52. Kiyonaka, S., Nakajima, H., Takada, Y., Hida, Y., Yoshioka, T., Hagiwara, A., Kitajima, I., Mori, Y. & Ohtsuka, T. Physical and functional interaction of the active

- zone protein CAST/ERC2 and the β -subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *J. Biochem. (Tokyo)* **152**, 149–159 (2012).
53. Billings, S. E., Clarke, G. L. & Nishimune, H. ELKS1 and Ca^{2+} channel subunit $\beta 4$ interact and colocalize at cerebellar synapses. *Neuroreport* **23**, 49–54 (2012).
54. Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaya, M., Hudspeth, A.J. & Lesage, F. RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* **34**, 411–423 (2002).
55. Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K.P. & Mori, Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nat. Neurosci.* **10**, 691–701 (2007).
56. Südhof, T. C. The presynaptic active zone. *Neuron* **75**, 11–25 (2012).
57. Wang, X., Hu, B., Zieba, A., Neumann, N.G., Kasper-Sonnenberg, M., Honsbein, A., Hultqvist, G., Conze, T., Witt, W., Limbach, C., Geitmann, M., Danielson, H., Kolarow, R., Niemann, G., Lessmann, V. & Kilimann, M.W. A protein interaction node at the neurotransmitter release site: domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and rim converge on the N-terminal domain of Munc13-1. *J. Neurosci.* **29**, 12584–12596 (2009).

58. Liu, C., Bickford, L.S., Held, R.G., Nyitrai, H., Südhof, T.C. & Kaeser, P.S. The active zone protein family ELKS supports Ca^{2+} influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **34**, 12289–12303 (2014).
59. Acuna, C., Liu, X., Gonzalez, A. & Südhof, T. C. RIM-BPs Mediate Tight Coupling of Action Potentials to Ca^{2+} -Triggered Neurotransmitter Release. *Neuron* **87**, 1234–1247 (2015).
60. Kaeser, P.S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. & Südhof, T.C. RIM proteins tether Ca^{2+} channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* **144**, 282–295 (2011).
61. Betz, A., Thakur, P., Junge, H.J., Ashery, U., Rhee, J.S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J. & Brose, N. Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* **30**, 183–196 (2001).
62. Wang, Y., Sugita, S. & Südhof, T. C. The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 20033–20044 (2000).
63. Yang, Y.-M., Fedchyshyn, M.J., Grande, G., Aitoubah, J., Tsang, C.W., Xie, H., Ackerley, C.A., Trimble, W.S. & Wang, L.-Y. Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca^{2+} influx to

- neurotransmitter release at a central synapse. *Neuron* **67**, 100–115 (2010).
64. Meier, J., Meunier-Durmort, C., Forest, C., Triller, A. & Vannier, C. Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *J. Cell Sci.* **113**, 2783–2795 (2000).
 65. Haselwandter, C. A., Kardar, M., Triller, A. & da Silveira, R. A. Self-assembly and plasticity of synaptic domains through a reaction-diffusion mechanism. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **92**, 032705 (2015).
 66. Sheng, J., He, L., Zheng, H., Xue, L., Luo, F., Shin, W., Sun, T., Kuner, T., Yue, D.T. & Wu, L.-G. Calcium-channel number critically influences synaptic strength and plasticity at the active zone. *Nat. Neurosci.* **15**, 998–1006 (2012).
 67. Schmidt, H., Brachtendorf, S., Arendt, O., Hallermann, S., Ishiyama, S., Bornschein, G., Gall, D., Schiffmann, S.N., Heckmann, M. & Eilers, J. Nanodomain Coupling at an Excitatory Cortical Synapse. *Curr. Biol.* **23**, 244–249 (2013).
 68. Neher, E. Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles. *Neuron* **87**, 1131–1142 (2015).
 69. Biró, Á. A., Holderith, N. B. & Nusser, Z. Quantal Size Is Independent of the Release Probability at Hippocampal Excitatory Synapses. *J. Neurosci.* **25**, 223–232 (2005).
 70. Fioravante, D. & Regehr, W. G. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr. Opin.*

- Neurobiol.* **21**, 269–274 (2011).
71. Wang, Y., Markram, H., Goodman, P.H., Berger, T.K., Ma, J. & Goldman-Rakic, P.S. Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nat. Neurosci.* **9**, 534–542 (2006).
72. Hosoi, N., Holt, M. & Sakaba, T. Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. *Neuron* **63**, 216–229 (2009).
73. Müller, C.S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H.-G., Meissner, M., Rammner, B., Striessnig, J., Flockerzi, V., Fakler, B. & Schulte, U. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14950–14957 (2010).
74. Watanabe, S., Rost, B.R., Camacho-Pérez, M., Davis, M.W., Söhl-Kielczynski, B., Rosenmund, C. & Jorgensen, E.M. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242–247 (2013).
75. Neher, E. & Sakaba, T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* **59**, 861–872 (2008).
76. Reyes, A., Lujan, R., Rozov, A., Burnashev, N., Somogyi, P. & Sakmann, B. Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat. Neurosci.* **1**, 279–285 (1998).

77. Losonczy, A., Zhang, L., Shigemoto, R., Somogyi, P. & Nusser, Z. Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons. *J. Physiol.* **542**, 193–210 (2002).
78. Pouille, F. & Scanziani, M. Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* **429**, 717–723 (2004).
79. Branco, T., Staras, K., Darcy, K. J. & Goda, Y. Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron* **59**, 475–485 (2008).

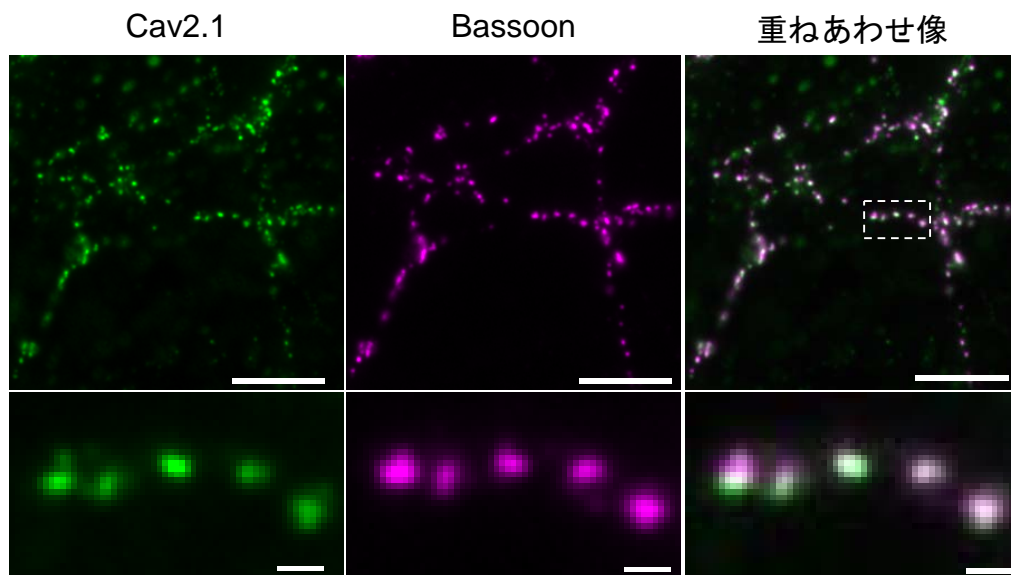


図1. 海馬分散培養神経細胞におけるCav2.1の分布
 Cav2.1（緑）とBassoon（マゼンタ）の蛍光顕微鏡像。海馬分散培養神経細胞を免疫染色し、従来の蛍光顕微鏡で観察した。Cav2.1の顕微鏡像（左上）とBassoonの顕微鏡像（中央上）を重ねあわせた（右上）。点線で囲った領域を拡大した（下段）。スケールバーはそれぞれ10 μm （上段）と1 μm （下段）を示す。

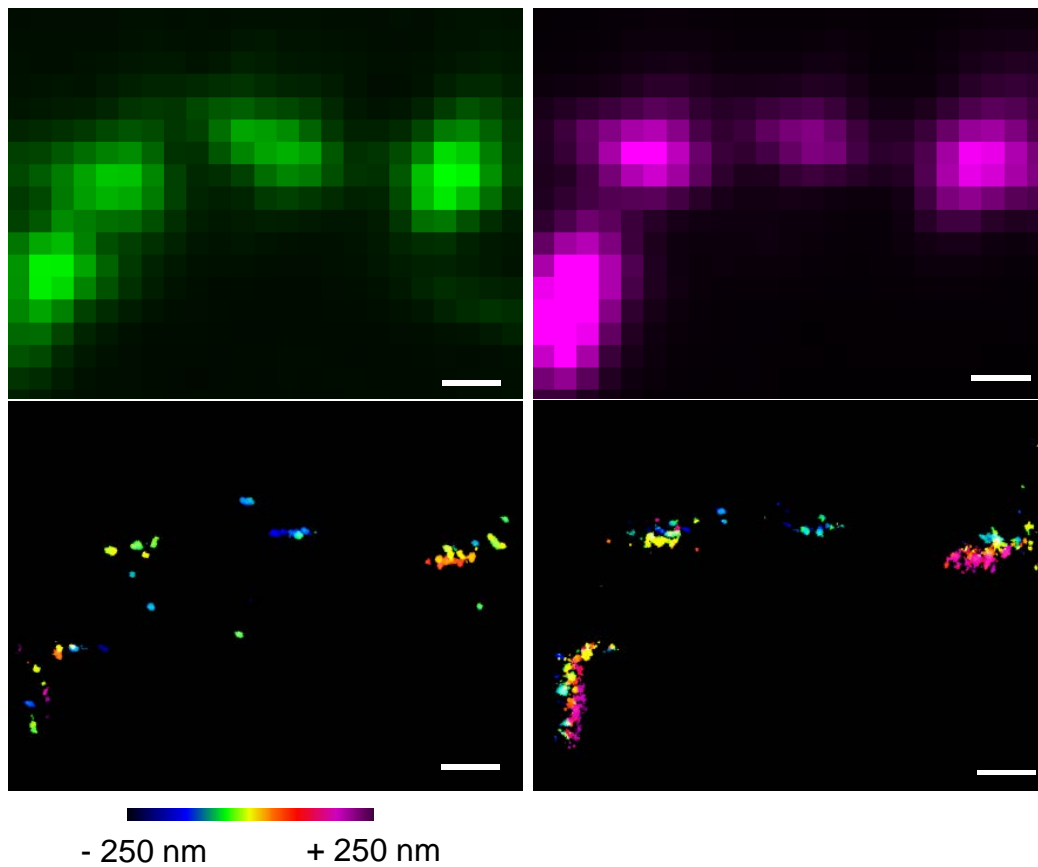


図2. 3D-STORM顕微鏡を用いたCav2.1とBassoonの観察
Cav2.1（左）とBassoon（右）の蛍光顕微鏡像（上段）と3D-STORM
像（下段）。海馬分散培養神経細胞を免疫染色し、各顕微鏡にて同一
視野を観察した。3D-STORM像の色はz軸方向の位置を示す。
スケールバーは500 nmを示す。

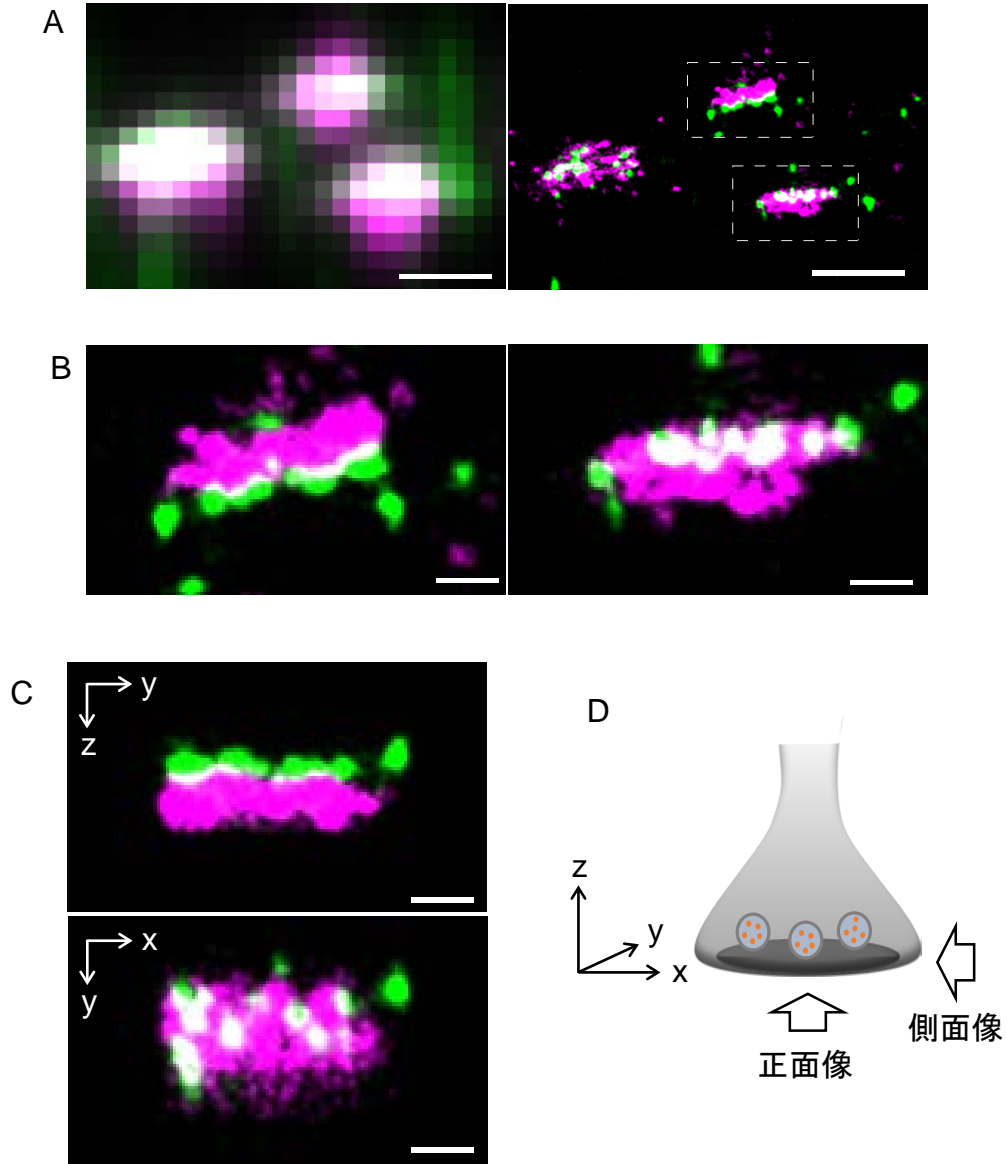


図3. アクティブゾーンにおけるCav2.1の空間配置

A. Cav2.1 (緑) と Bassoon (マゼンタ) の 蛍光顕微鏡 (左上) と 3D-STORM 像 (右上)。Cav2.1 と Bassoon を免疫染色し、各顕微鏡にて同一視野を観察した。

B. A の右の図の点線で囲まれた領域の拡大像。

C. Cav2.1 のアクティブゾーンの側面像 (上) と正面像 (下)。B 左図で表示したアクティブゾーンにおける 3D-STORM 像を回転させ、アクティブゾーンの側面像と正面像を作製した。

D. 正面像と側面像を模式図を用いて表した。

スケールバーはそれぞれ $1\ \mu\text{m}$ (A) と $200\ \text{nm}$ (B, C) を示す。

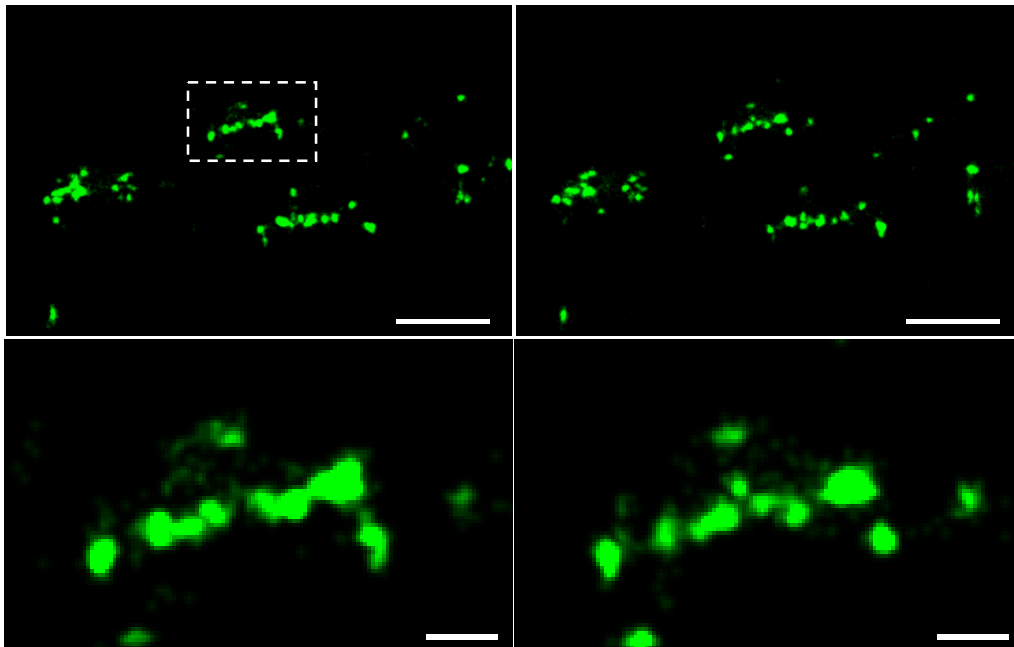


図4. Cav2.1の3D-STORM像の再現性試験

Cav2.1の3D-STORM顕微鏡測定の前半から再構築した画像(左上)、と後半から再構築した画像(右上)。点線で囲まれた領域を拡大した(下段)。スケールバーはそれぞれ1 μm (上段)と200 nm(下段)を示す。

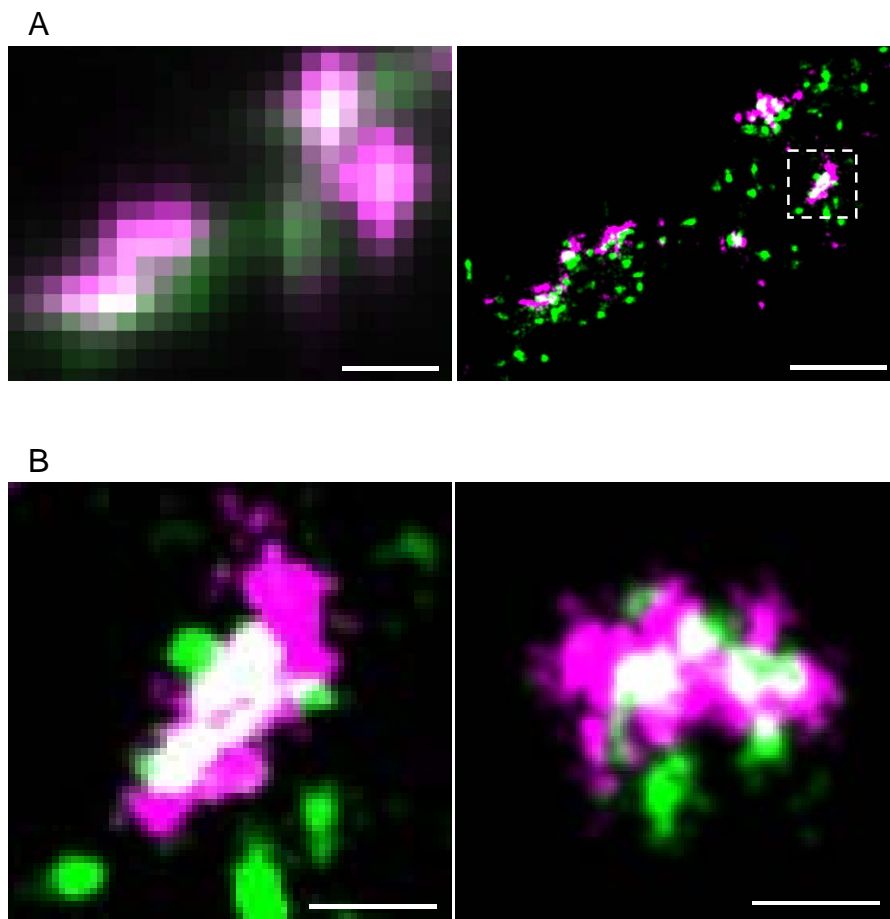


図5. 異なるCav2.1 抗体を用いたアクティブゾーンにおけるCav2.1のクラスターの検証

A. 抗Cav2.1抗体（#152 205）を用いて標識したCav2.1の 蛍光顕微鏡像（左）、と3D-STORM像（右）。Cav2.1（緑）とBassoon（マゼンタ）を免疫染色し、各顕微鏡にて同一視野を観察した。

B. A右図の点線で囲まれたアクティブゾーンの拡大像（左）とアクティブゾーン正面像（右）。

スケールバーはそれぞれ1 μm (A)と200 nm(B)を示す。

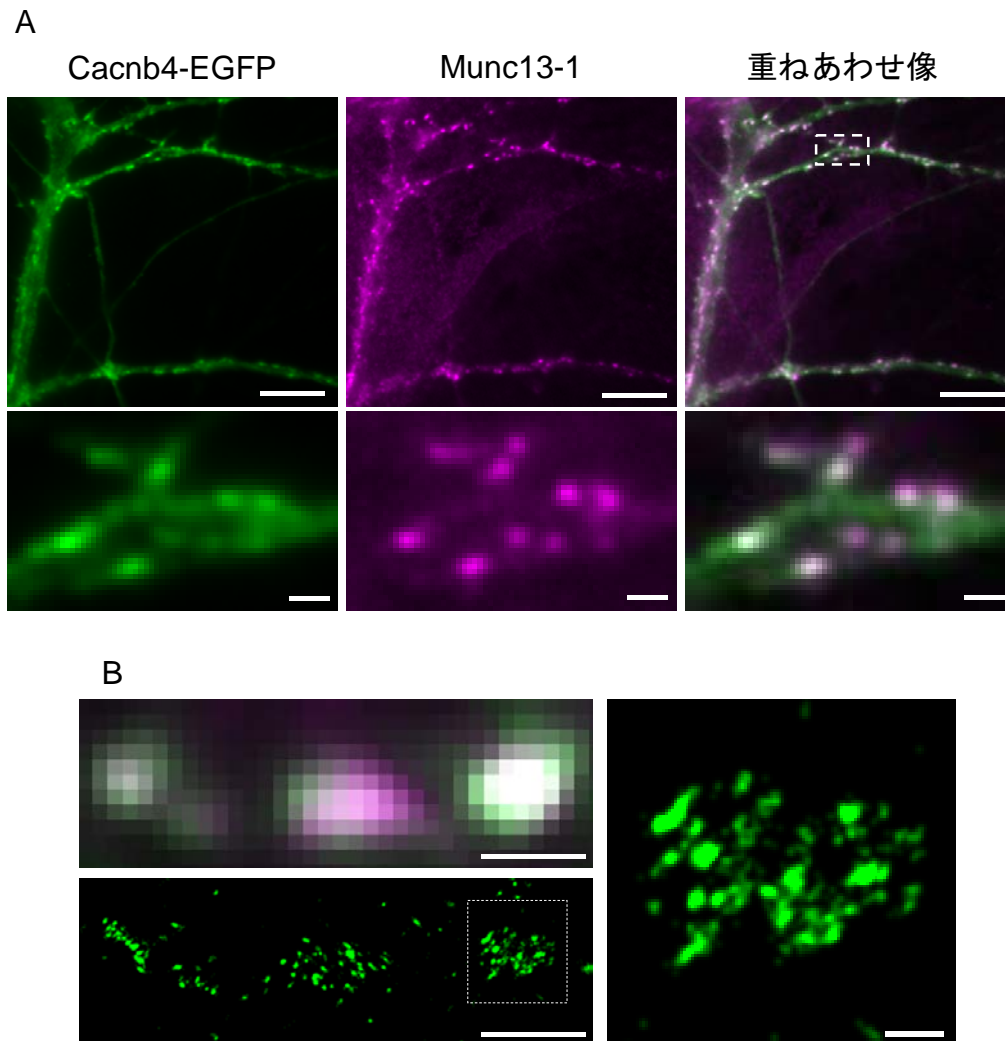


図6. アクティブゾーンにおけるカルシウムチャンネル β 4サブユニットの空間配置

A. Cacnb4-EGFP (緑) と Munc13-1 (マゼンタ) の蛍光顕微鏡像。Cacnb4-EGFPを発現させた神経細胞を、抗GFP抗体と抗Munc13-1抗体を用いて免疫染色した。Cacnb4-EGFPの免疫染色像とMunc13-1の免疫染色像を重ねあわせた(右上)。点線で囲まれた領域を拡大した(下段)。

B. Cacnb4-EGFPの蛍光顕微鏡像 (左上) と3D-STORM像 (左下)。Cacnb4-EGFPを発現させた神経細胞を、抗GFP抗体 (緑) と抗Munc13-1抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色し、各顕微鏡にて同一視野を観察した。点線で囲まれた領域を拡大した(右)。

スケールバーはそれぞれ10 μ m(A上段)、1 μ m(A下段, B左上、左下)と200 nm(B右)を示す。

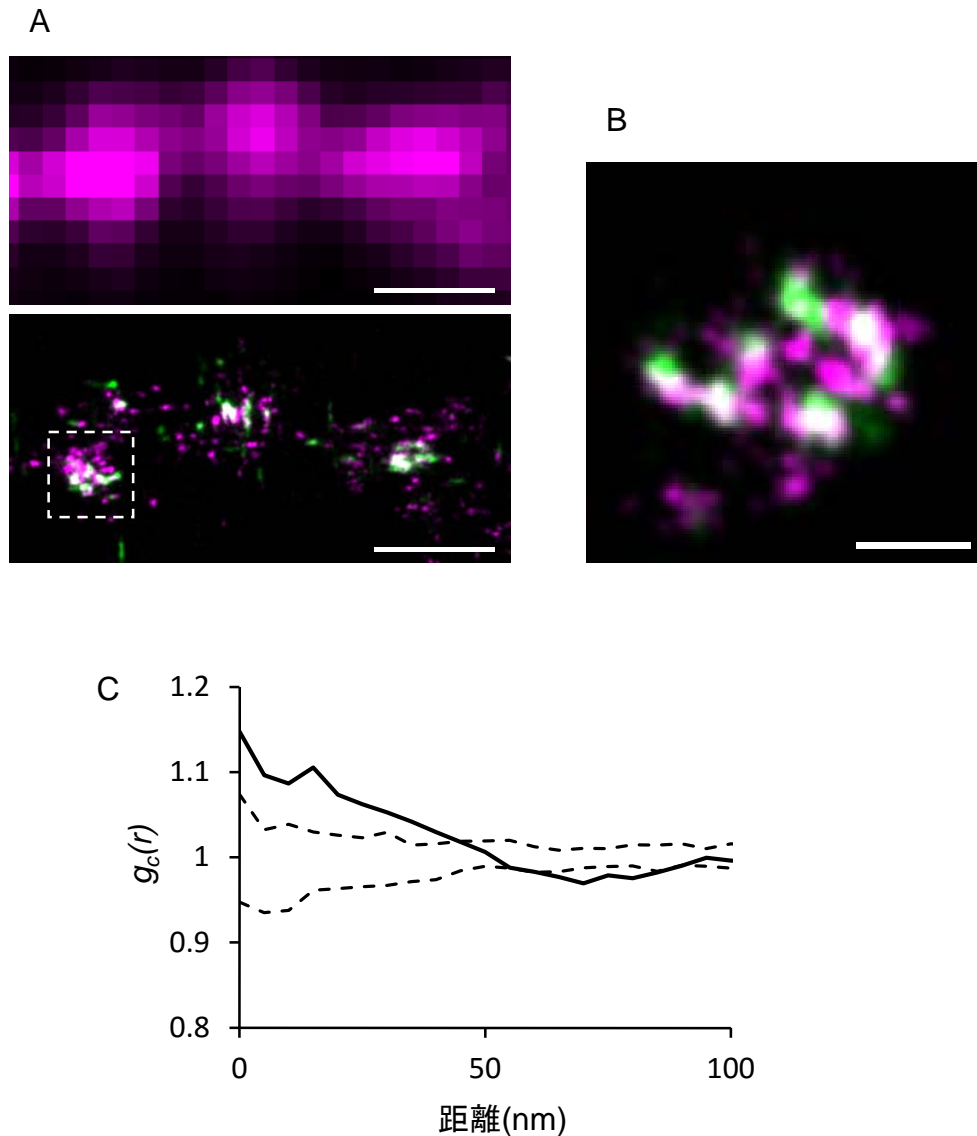


図7. Cav2.1とCacnb4の共局在

A. Cav2.1（緑）とCacnb4-EGFP（マゼンタ）の蛍光顕微鏡像(上段)、及び3D-STORM像（下段）。Cacnb4-EGFPを発現させた神経細胞について、Cav2.1とGFPを免疫染色し、各顕微鏡にて同一視野を観察した。

B. A内の点線で囲まれたアクティブゾーンの正面像

C. Cav2.1とCacnb4-EGFPのPCF解析。アクティブゾーンにおけるCav2.1とCacnb4-EGFPの位置関係をPCF解析を用いて評価した。点線はCacnb4-EGFPがランダムに配置していると仮定した時のPCF解析結果の95%信頼区間を表す。n = 6 アクティブゾーン

スケールバーはそれぞれ1 μm (A)、200 nm(B)を示す。

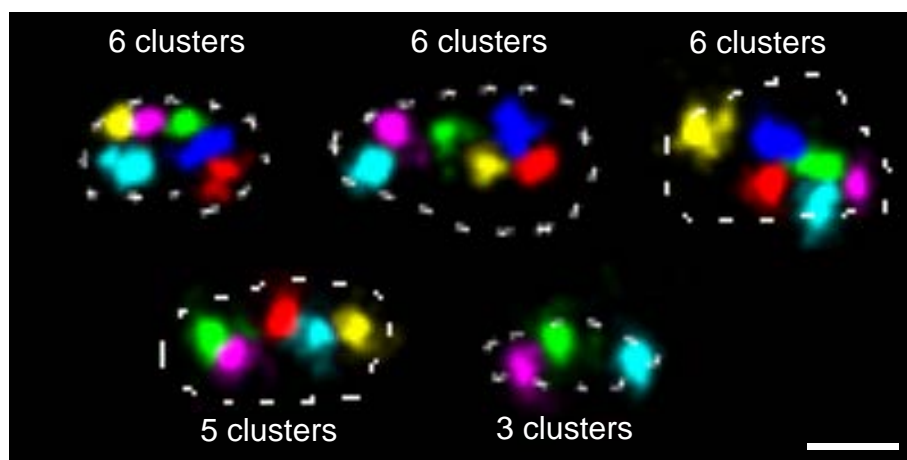


図8. Cav2.1の3D-STORM像のクラスタリング

Cav2.1のアクティブゾーン正面像のクラスタリング結果の代表例。階層的クラスタリングを用いることで、Cav2.1のアクティブゾーンの正面像を複数のクラスターに分割した。分割された異なるクラスターはそれぞれ異なる色に分けて表示した。点線はBassoonの3D-STORM像から推定したアクティブゾーンの境界線を表す。スケールバーは200 nmを示す。

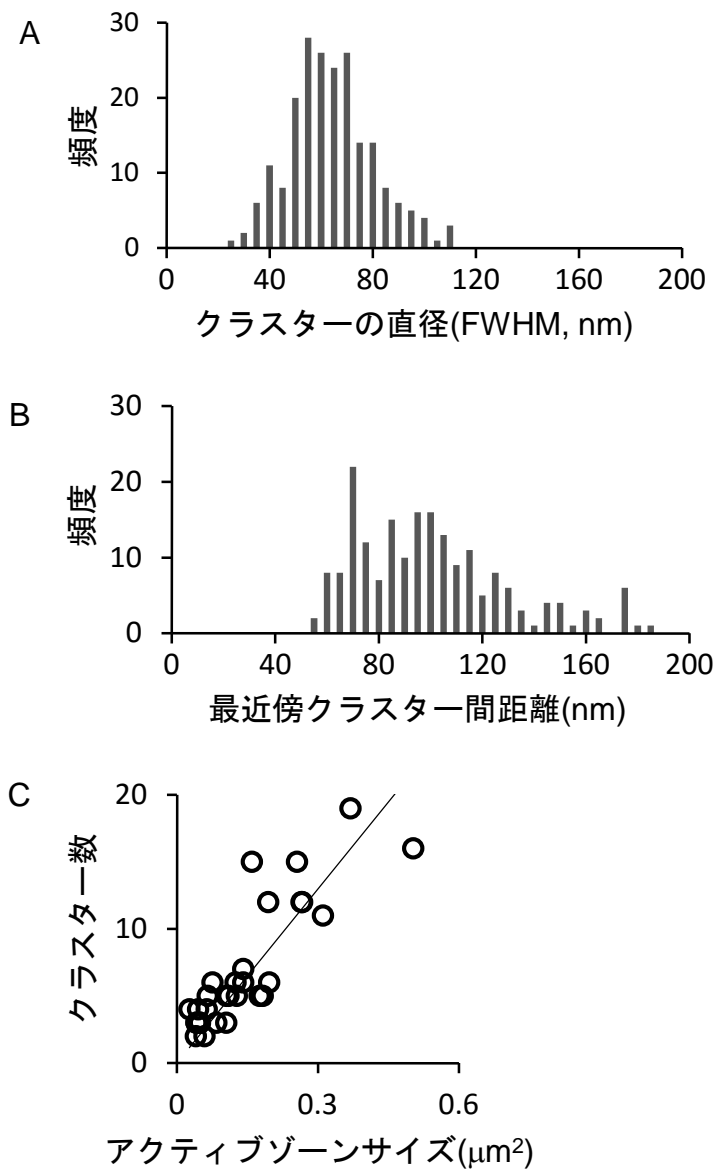


図9. Cav2.1のクラスターの定量的解析

A. Cav2.1のクラスターの直径のヒストグラム。クラスタリングにより分割されたクラスターの直径を定量した。中央値は60 nmであった。

B. Cav2.1のクラスターにおける最近傍クラスター間距離のヒストグラム。クラスタリングにより分割されたクラスターについて、最近傍クラスター間距離を定量した。中央値は95 nmであった。

C. アクティブゾーンサイズとCav2.1のクラスター数の関係。Bassoonの3D-STORM像より推定したアクティブゾーンの面積とクラスタリングにより分割されたCav2.1のクラスターの数との関係を解析した。黒線は原点を通る回帰直線であり、傾きは43.2、相関係数(r)は0.83であった。n = 30アクティブゾーン。

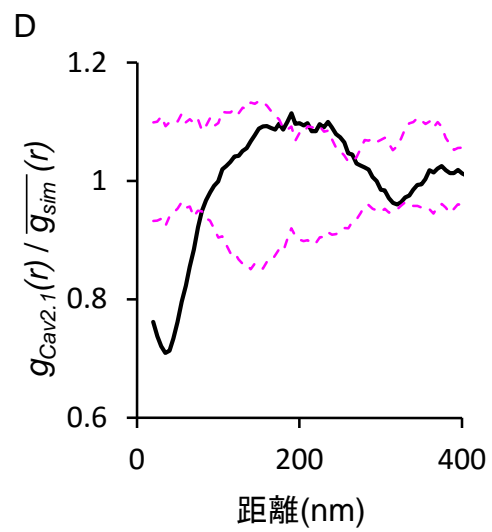
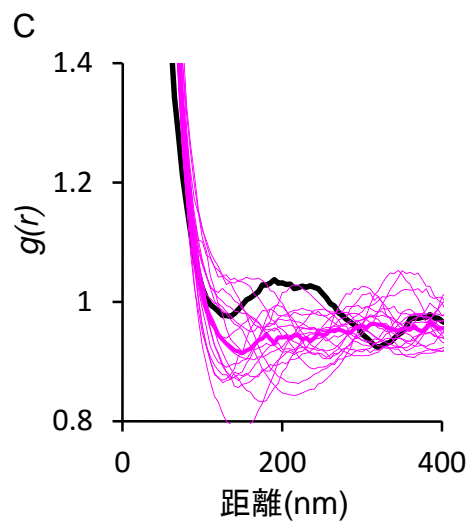
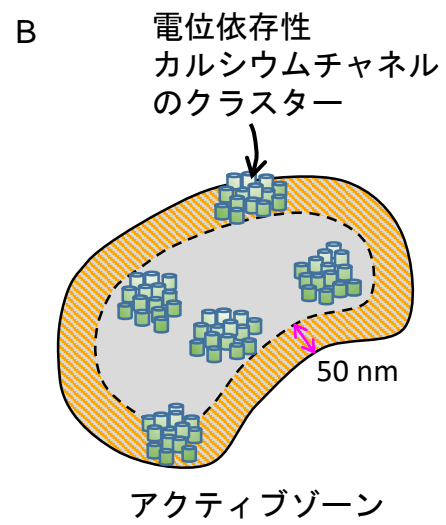
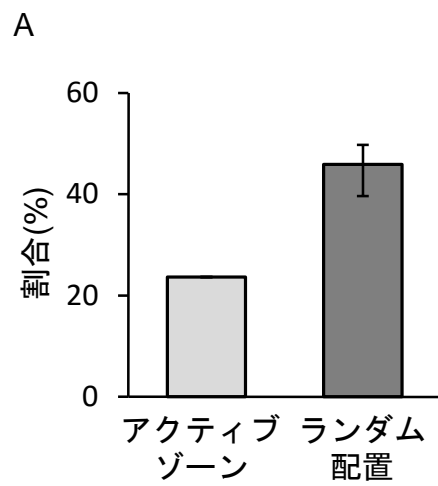


図10. Cav2.1のクラスターの空間配置

- A. アクティブゾーンの縁に配置するCav2.1のクラスターの割合。
Bassoonの3D-STORM像より推定したアクティブゾーンの縁から50 nm以内に配置するCav2.1のクラスターの割合を解析した（アクティブゾーン）。また、アクティブゾーン内にランダムに配置したクラスターをシミュレーションを用いて作製し、アクティブゾーンの縁から50 nm以内に配置するクラスターの割合を解析した（ランダム配置）。ランダム配置のエラーバーは95%信頼区間を示す。n = 30アクティブゾーン、207クラスター。
- B. アクティブゾーンの縁の模式図。図Aでは斜線部で表したアクティブゾーンの縁に存在するCav2.1のクラスターの割合を定量した。アクティブゾーンはBassoonの3D-STORM像より推定した。
- C. Cav2.1のPCF解析。アクティブゾーンにおけるCav2.1の分子間の位置関係をPCF解析を用いて評価した（黒線）。また、アクティブゾーン内にランダムに配置したクラスターをシミュレーションにて生成し、PCF解析を行った。19回のシミュレーションデータそれぞれから求めた $g(r)$ （マゼンタ細線）とその平均値（マゼンタ太線）を記す。n = 30アクティブゾーン
- D. Cav2.1のクラスターとランダムに配置したクラスターの比較。
Cav2.1のPCF解析結果($g_{Cav2.1}(r)$, 図C黒実線)をランダムに配置したクラスターのPCF解析結果 ($\overline{g_{sim}}(r)$, 図Cマゼンタ実線)で規格化した。点線はクラスターがランダムに配置していると仮定した時の95%信頼区間を示す。

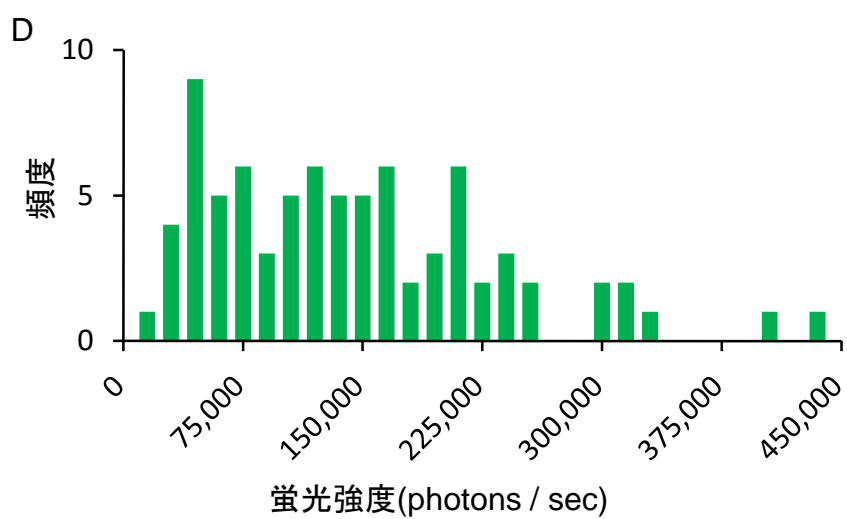
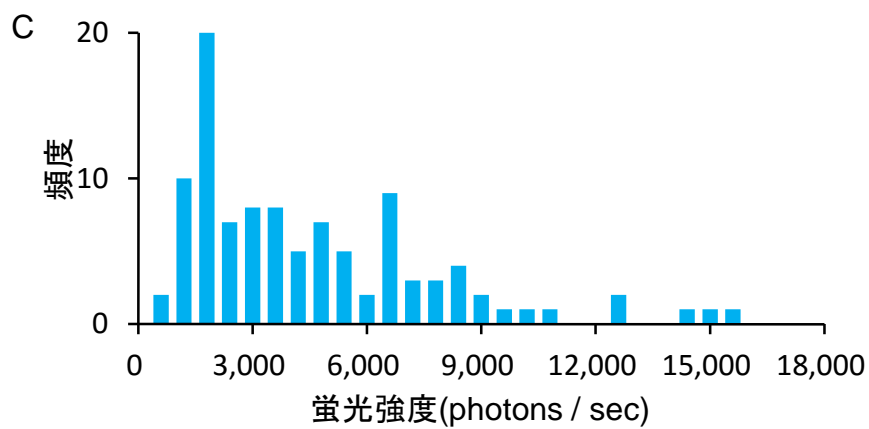
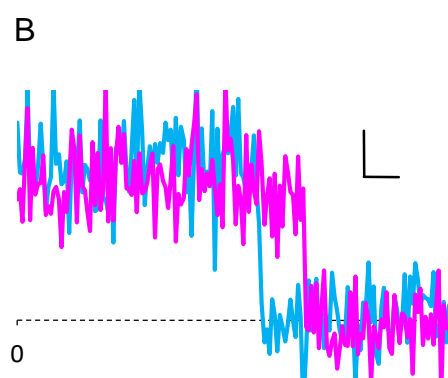
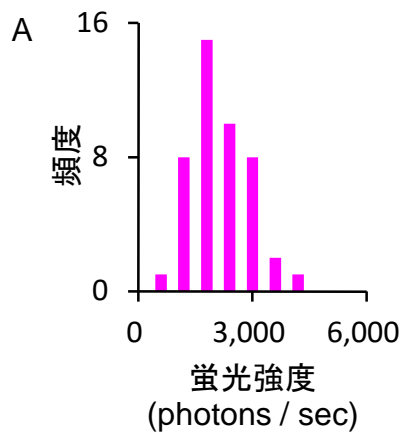


図11. シナプス前終末におけるCav2.1の分子数の定量

- A. Alexa Fluor 647一分子の蛍光強度のヒストグラム。カバーガラス上に散布したAlexa Fluor 647一分子の蛍光強度を蛍光顕微鏡にて測定した。
- B. Alexa Fluor 647一分子の蛍光強度の時間変化。図Aで測定したAlexa Fluor 647一分子の蛍光強度の経時変化の代表例を示す。スケールバーは縦軸が500 photons / sec、横軸が2秒を示す。
- C. Alexa Fluor 647で標識した抗Cav2.1モノクローナル抗体（Alexa Fluor 647 Cav2.1 mAb）一分子の蛍光強度のヒストグラム。カバーガラス上に散布したAlexa Fluor 647 Cav2.1 mAb一分子の蛍光強度を蛍光顕微鏡にて測定した。
- D. Cav2.1の免疫染色強度のヒストグラム。神経細胞をAlexa Fluor 647 Cav2.1 mAbにて免疫染色し、単一のシナプス前終末の蛍光強度を測定した。

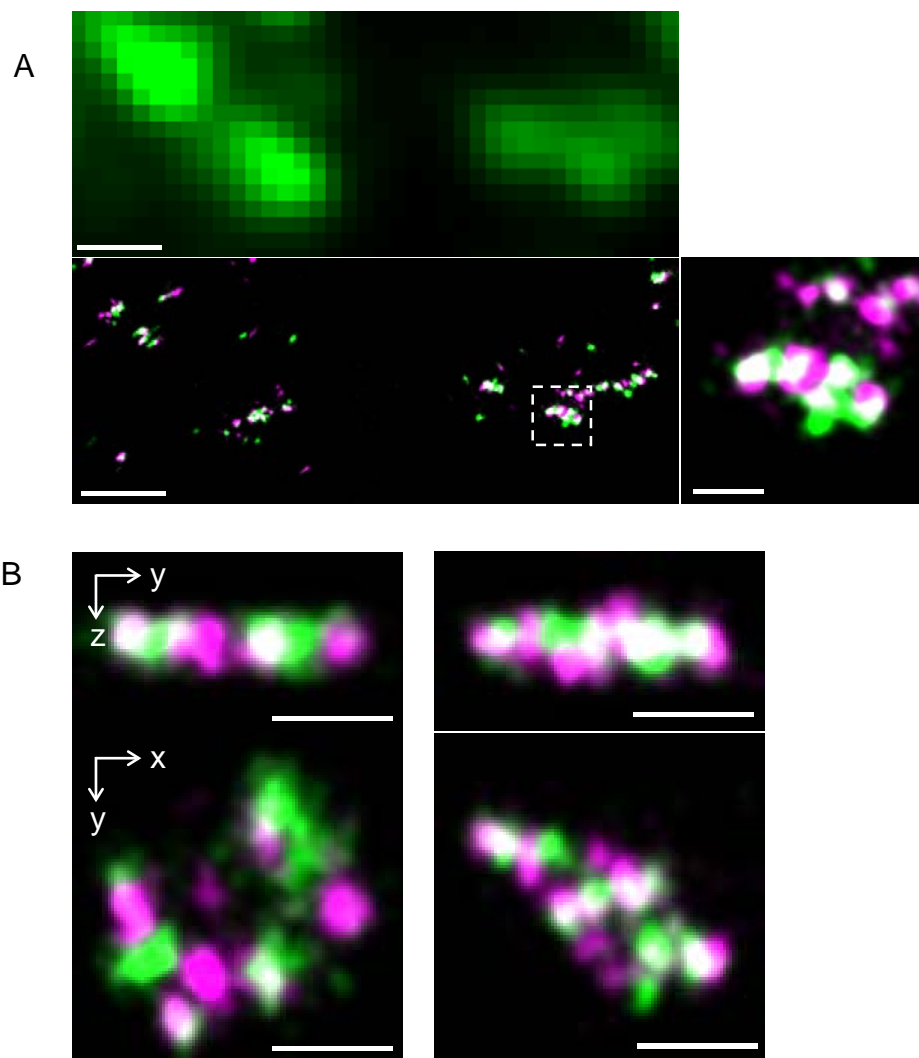


図12. Cav2.1とMunc13-1のアクティブゾーンにおける位置関係

A. Cav2.1（緑）とMunc13-1（マゼンタ）の従来の蛍光顕微鏡像(左上)、及び3D-STORM像（左下）。Cav2.1とMunc13-1を免疫染色し、各顕微鏡にて同一視野を観察した。点線で囲まれた領域を拡大した(右下)。

B. Cav2.1（緑）とMunc13-1（マゼンタ）のアクティブゾーンにおける側面像（上段）と正面像（下段）。アクティブゾーンにおけるCav2.1とMunc13-1の3D-STORM像を回転させ、アクティブゾーンの側面像と正面像を作製した。左側に示したアクティブゾーンはAの点線で囲まれたアクティブゾーンである。

スケールバーはそれぞれ1 μm (A左上下)、200 nm(A右下, B)を示す。

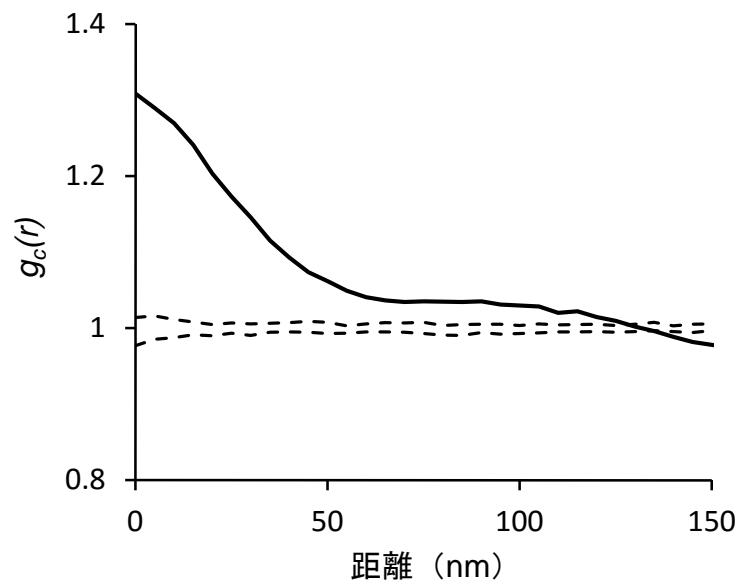


図13. アクティブゾーンにおけるCav2.1とMunc13-1の位置関係の解析
 Cav2.1とMunc13-1のPCF解析。アクティブゾーンにおけるCav2.1と
 Munc13-1の位置関係をPCF解析により評価した。点線はCav2.1がランダ
 ムに配置していると仮定した時のPCF解析結果の95%信頼区間を表す。
 n = 29 アクティブゾーン

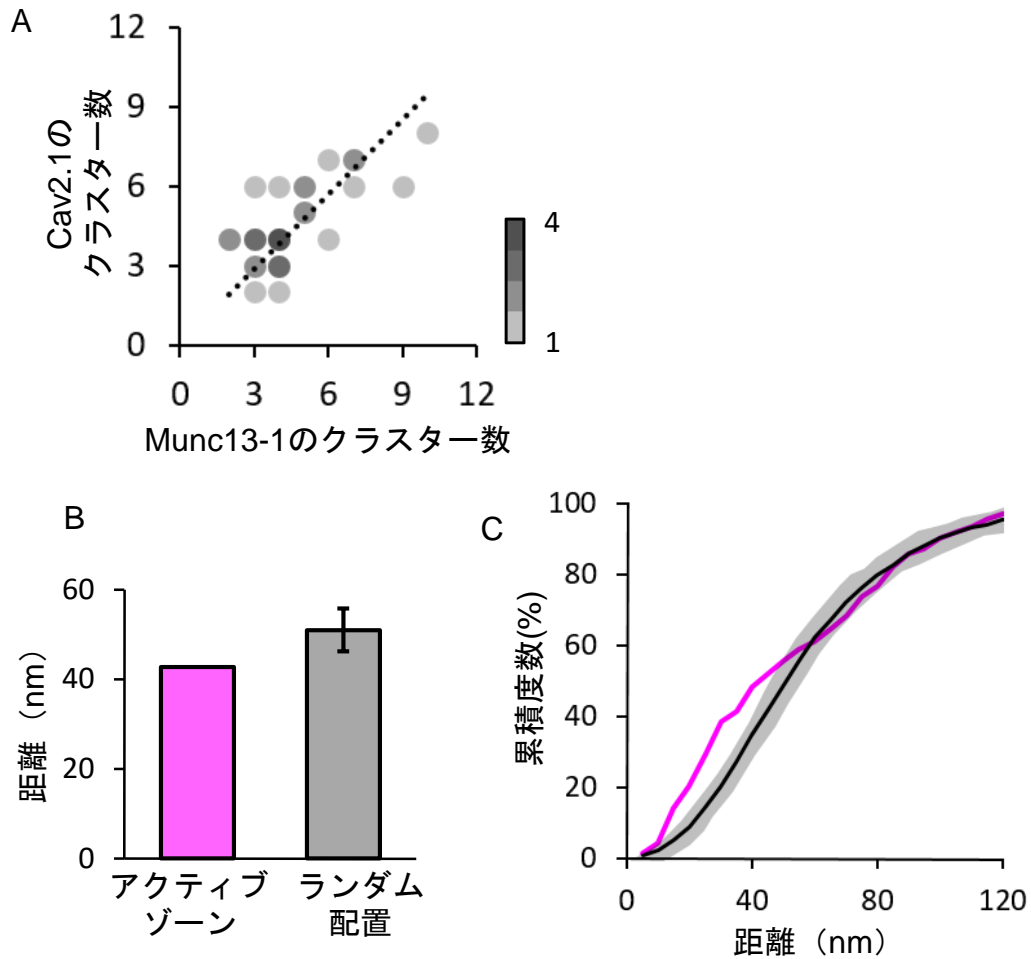


図14. Cav2.1のクラスターとMunc13-1のクラスターの関係の解析
A. Munc13-1とCav2.1のクラスターの数の相関解析。各々のアクティブゾーンにおけるMunc13-1のクラスター数とCav2.1のクラスター数の関係を解析した。点の濃さはアクティブゾーン数を表す。原点を通る回帰直線を求めた（点線, 傾き = 0.95, $r = 0.71$, $n = 29$ アクティブゾーン）。
B. Cav2.1のクラスターから最近傍のMunc13-1のクラスターまでの距離の中央値。アクティブゾーンに配置するCav2.1のクラスターそれぞれについて、最近傍のMunc13-1のクラスターまでの距離を解析し、その中央値を示した（アクティブゾーン）。また、Cav2.1のクラスターがアクティブゾーン内にランダムに配置していると仮定した時の、最近傍のMunc13-1のクラスターまでの距離を、シミュレーションを用いて解析し、その中央値を示した（ランダム配置）。ランダム配置のエラーバーは95%信頼区間を表す。 $n = 133$ クラスター。
C. Cav2.1のクラスターから最近傍のMunc13-1のクラスターまでの距離の累積度数分布。Cav2.1のクラスターから最近傍のMunc13-1のクラスターまでの距離を累積度数分布で表示した（マゼンタ）。黒実線と灰色の領域はそれぞれ、Cav2.1のクラスターがランダムに配置していると仮定した時の累積度数分布の中央値と95%信頼区間を示す。

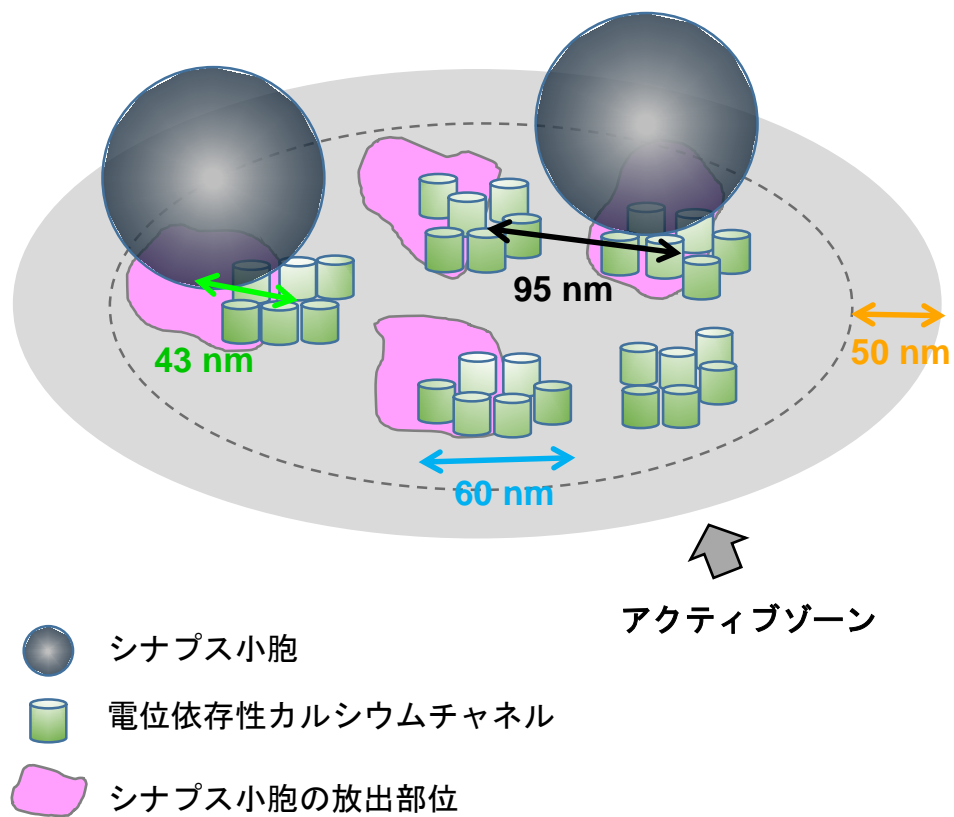


図15. 電位依存性カルシウムチャネルの空間配置の模式図

本研究で明らかとなった電位依存性カルシウムチャネルの空間配置。電位依存性カルシウムチャネルはアクティブゾーンにおいてクラスターを形成しており、クラスター同士は重ならず規則的に配置している。また、電位依存性カルシウムチャネルのクラスターはシナプス小胞の放出部位の近傍に配置している。

謝辞

本研究にあたり、6 年間という長きに渡り終始ご指導ご鞭撻を賜りました廣瀬謙造教授に甚深なる感謝の意を表します。また、論文の作成から日々の研究遂行まで多岐に渡ってご指導ご助言頂きました並木繁行助教には心より感謝申し上げます。様々な場面で、協力し助けて頂きました神経生物学教室の皆様に深く御礼申し上げます。