

論文の内容の要旨

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

背景

シナプス前終末では、アクティブゾーンと呼ばれる限局した領域においてシナプス小胞の開口放出が行われる。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。シナプス小胞が開口放出を行う場所（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距離はシナプス小胞が開口放出する確率を決定する重要な因子であると考えられてきた。しかしながら、現在に至る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わかっていない。

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構成分子を観察できれば、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の位置関係を明らかにすることができるはずである。しかしながら従来の蛍光顕微鏡では空間分解能の限界により、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、分子の位置関係を解析することは不可能であった。そこで本研究では、超解像顕微鏡技術である 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の位置関係の解析を行った。

方法

海馬分散培養神経細胞を、標的分子を認識する抗体を用いて免疫染色した。染色した標本は従来の蛍光顕微鏡、あるいは3次元モードの STORM 顕微鏡 (3D-STORM 顕微鏡) にて観察した。取得した 3D-STORM 像は回転させ、アクティブゾーンを、アクティブゾーン平面から垂直な方向から見た画像（正面像）を作成した。

結果と考察

STORM 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

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 を免疫染色し、3D-STORM 顕微鏡を用いてアクティブゾーンにおける Cav2.1 を観察した。その結果、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することが明らかとなった。また、電位依存性カルシウムチャネルの $\beta 4$ サブユニット (Cacnb4) についてもアクティブゾーンにおける空間配置を解析するために、神経細胞に Cacnb4 と EGFP を融合させたタンパク質 (Cacnb4-EGFP) を発現させ、免疫染色した。染色した Cacnb4-EGFP を 3D-STORM 顕微鏡を用いて観察したところ、Cacnb4-EGFP もアクティブゾーンにおいてクラスターを形成していた。更に、Cav2.1 と Cacnb4-EGFP の位置関係を 3D-STORM 顕微鏡にて解析したところ、両者がアクティブゾーンにおいて共局在することが示された。

Cav2.1 のクラスターの性質を定量的に解析したところ、Cav2.1 のクラスターの大きさは 60 nm (中央値)、最近接クラスター間距離は 95 nm (中央値) であった。また、Cav2.1 のクラスターは、1つのアクティブゾーンにつき平均で 7 個存在することが示された。クラスターの数にはアクティブゾーンの面積と強い相関関係にあり ($r = 0.86$)、アクティブゾーン 1 μm^2 当たり 43 個のクラスターが存在していることが明らかとなった。1つのアクティブゾーンに存在する Cav2.1 の分子数を推定したところ、平均で 41 分子存在していることが示され、ひとつの Cav2.1 のクラスターは 6 分子程度の Cav2.1 により形成されていると推定された。続いて PCF 解析を用いてアクティブゾーンにおける Cav2.1 の空間配置を解析したところ、各々の Cav2.1 のクラスターから 90 nm 以内では他の Cav2.1 のクラスターの存在確率が低いことが示され、Cav2.1 のクラスターが一定の間隔を保って配置していることが明らかとなった。

活動電位に応じて電位依存性カルシウムチャネルが開口する確率は 25%程度であることが知られている。そのため、電位依存性カルシウムチャネルはクラスター化することで、活動電位に応じて安定してカルシウムが流入する場所を形成していると考えられる。

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の解析

シナプス小胞の放出部位の構成分子である Munc13-1 と Cav2.1 を 3D-STORM 顕微鏡にて観察した。その結果、Cav2.1 と Munc13-1 それぞれがアクティブゾーンにおいてクラスターを形成しており、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。Cav2.1 のクラスター数と Munc13-1 のクラスター数の関係を解析したところ、強い相関が見られ ($r = 0.71$, 傾き $= 0.95$)、1 つの Munc13-1 のクラスターに対し、1 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。また、Cav2.1 のクラスターについて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) であり、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 Cav2.1 のクラスターから最近接の Munc13-1 のクラスターまでの距離 (46 ~ 56 nm, 95 %信頼区間) よりも近かった。よって Cav2.1 のクラスターは Munc13-1 のクラスターの近傍に配置していることが明らかとなった。

Munc13-1 はシナプス小胞の放出部位の構成分子であるため、Munc13-1 のクラスターが存在する場所はシナプス小胞の放出部位であると考えられる。よって、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と考えられる。

結論

本研究では、STORM 顕微鏡を用いた解析により、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明らかにした。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クラスターを形成していることが示された。シナプス小胞の放出部位の近傍に配置したクラスター化した電位依存性カルシウムチャネルは、シナプス小胞の開口放出において重要な機能を担っていると考えられる。