2R26

カエル神経筋接合部でのピクリン酸による伝達物質放出の増大

○竹内幹夫、鈴木慎一、小山内実[1]、鈴木直哉、木島博正（名大・理,[1]杏林大・医）

我々の研究室では、トノサマガエル *Rana nigromaculata* の神経筋接合部を用いて以前2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid(TNBS)が神経伝達物質の放出量を一過的に上昇させることを発見した(Tanabe & Kijima 1987)。TNBSはインパルスと同期した放出(EPP)を増大させ、自発的な放出(MEPP)の頻度を非常に増加させるという効果を持つが、EPPの増大はTNBSの投与の後急激な上昇を示し、その後ゆっくりと減少するという二相性の効果があり、解析が困難であった。そのためTNBSのどの部位が効いているのかを調べるために、TNBSのアミノ基修飾効果を無くすためにスルホン酸基を 2-hydroxyethylamino 基で置換した 1-(hydroxyetylamino)-2,4,6-trinitrobenzene(HEATNB)というTNBSの誘導体を合成し、TNBSの効果がアミノ酸の修飾効果ではなく、トリニトロベンゼンの部分でなされることを示した(Osanai et al 1995)。しかしながら、HEATNBは毒性が強く、0.2mM以上加えると神経と筋繊維が死んでしまうという欠点があった。今回我々は、TNBSのアナログである2,4,6-trinitrophenol(ピクリン酸)を用いた。ピクリン酸はHEATNBと類似した効果を示し、高濃度の投与が可能である。ピクリン酸は0.05mM程度で効き始め、EPPの振幅を増大し、2mMの投与では100倍以上になった。また、EPPの増大以上はMEPP頻度は増大しなかった。さらに、神経終末のCa^{2+}イメージングの結果、ピクリン酸による刺激中のCa^{2+}の流入の増大は起こらなかった。EPPの増大は静止状態での細胞内Ca^{2+}の増大や流入量の増大では説明できず、放出機構に何らかの効果を及ぼしている事を示している。ただ、0.4mMのピクリン酸の投与によって静止状態でのCa^{2+}指示薬の蛍光が増大しており、これがCa^{2+}の上昇によるのかどうかは更なる検討が必要である。また低Ca^{2+}濃度下ではCa^{2+} 4乗則を崩さずにEPP振幅を増大させる事が分かった。さらに短期可塑性について調べた結果、HEATNBと同様に増進、増強に影響を及ぼすことがわかった。

M.Takeuchi, S.Suzuki, M.Osanai, N.Suzuki, H.Kijima: The Increase of Neurotransmitter Release by Picric Acid at Frog Neuromuscular Junction

2R27

AFMによる神経伝達物質開口放出部位の極微細内部構造観察

○戸島拓郎, 山根ゆか子, 川端和重, 伊藤悦朗, 高木博[1], 竹下智子[2], 吉岡亨[2], 牛木辰男[3], 阿部和厚[4]（北大・院理,[1]信州大・医,[2]早大・人間科学,[3]新潟大・医,[4]北大・医）

神経細胞のシナプス前膜では，細胞内Ca^{2+}濃度の上昇によって，シナプス小胞のエキソサイトーシスが起こり，神経伝達物質が細胞外に放出される。この伝達物質放出のメカニズムを解明するために，今回我々は，神経細胞でのエキソサイトーシス開口部位の極微細内部構造を，原子間力顕微鏡(AFM)と走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

実験材料として，シナプス前細胞の研究材料として適している mouse neuroblastoma×rat glioma の雑種細胞株である NG108-15 を用いた。我々はこの細胞を 1 mM Bt_2cAMP 添加した培養液中で2日間神経分化誘導し，観察に用いた。AFM用標本は，2% glutaraldehyde と 1% OsO_4で固定した後，臨界点乾燥させた。SEM用標本は，同じ固定後，tannic acid と OsO_4で導電染色し，臨界点乾燥後，Ptコーティングを施した。AFMは，SEM観察において必要な金属コーティングなどの処理が不必要なため，試料表面のより正確な微細情報が得られることが期待されている。

SEMでは，NG108-15 の varicosity の表面に直径 50 - 100 nm の開口構造が観察されたが，5 mM EGTA 処理によりこの構造は激減した。一方，P.Greengard らの報告によると，NG108-15 の varicosity の内部には直径 40 - 160 nm のシナプス小胞が多数蓄積されており，これらのことから，SEMで観察された開口構造は，Ca^{2+}依存性で起こるシナプス小胞のエキソサイトーシスの開口部位であると推定された。

次に，我々はAFMで同様の開口構造を観察することに世界で初めて成功した。しかも，SEMでは確認されていなかった，開口内部の極微細構造が明らかになった。AFM観察で認められた構造は，開口部位が放射状をなし，深さは 70 nm 程度であった。また，底部には直径 10 nm 程度の隆起が数個確認された。このAFMの観察結果は，エキソサイトーシス機構解明に大変重要な役割を果たすと考えられる。

T.Tojima, Y.Yamane, K.Kawabata, E.Ito, H.Takagi, T.Takeshita, T.Yoshioka, T.Ushiki, K.Abe: Fine structure of exocytotic aperture in nerve cells revealed by AFM

2R28

カエル神経筋接合部シナプス前末端内Ca^{2+}高速処理機構

○鈴木慎一,鈴木直哉,小山内実[1],久場健司[2],木島博正（名古屋大・理,[1]杏林大・医・第二生理,[2]名古屋大・医・第一生理）

我々の研究室では *Noran* 社の共焦点顕微鏡を用いた高速のCa^{2+}イメージングによるシナプス前末端の細胞内Ca^{2+}濃度測定($[Ca^{2+}]_i$)を行い、電気生理による結果と併せてシナプス前末端からの神経伝達物質放出機構におけるCa^{2+}の役割、特に短期可塑性と呼ばれる数十 ms～数分の減衰時定数を持つ神経伝達物質放出の刺激後促進との関連性を主に調べている。

トノサマガエル *Rana nigromaculata* の胸皮筋 *cutaneous pectoris* の神経筋接合部シナプス前末端におけるイメージング測定の結果、連続刺激により上昇した$[Ca^{2+}]_i$は刺激終了と共にその大部分が 50ms～80ms 程度の時定数で急速に減衰した。これはザリガニの神経筋接合部や、ラットの脳のシナプスにおいて観測される数秒の時定数の減衰よりかなり速い。これはシナプスの短期可塑性のうち、速い促通(τ ~40ms)より少し遅く、速い促通は活性帯のCa^{2+} domain の減衰を反映しているものと考えられる。

今回、細胞内オルガネラの一つであるミトコンドリアの脱共役剤であるCCCPを効かせたところ、この速い$[Ca^{2+}]_i$の減衰成分が減少、あるいは完全に消えるという結果が得られ、ミトコンドリアのCa^{2+}の取り込みが速い減衰の原因である可能性が高いことがわかった。また通常は高頻度刺激を数秒与えているとある一定の濃度で$[Ca^{2+}]_i$は安定するが、CCCPを効かせた場合はなかなかプラトーに達せず、達する値も通常より高い。これらの結果より、ミトコンドリアのCa^{2+}取り込みがシナプス前末端における高速の$[Ca^{2+}]_i$調整機構で大きな役割を果たしていると思われる。

S.Suzuki,N.Suzuki,M.Osanai,K.Kuba,H.Kijima: Rapid calcium control system in the presynaptic nerve terminal of the frog neuromuscular junction

2R29

神経細胞形態へのシナプシンIIとコリンアセチル転移酵素の影響

○山根ゆか子, 戸島拓郎, 伊藤悦朗, 吉田明[1], 三澤日出巳[2], 杉山崇[3], 吉岡亨[3]（北大院理, [1]長崎大薬, [2]都神経研神経学, [3]早大人間科学）

継代培養系として樹立しているNG108-15は，ニューロブラストーマとグリオーマの雑種細胞であり，神経細胞の諸性質を調べるのに適している。本講演では，第32回と第33回の大会で杉山らが報告した，シナプシンIIとコリンアセチル転移酵素（ChAT）のcDNAをダブルトランスフェクションしたNG108-15細胞の形態観察を行った。この細胞では，細胞あたりの突起数（N/C），細胞あたりのバリコシティ数（V/C），そして突起あたりのバリコシティ数（V/N）の全てが増加していた。ところで，シナプシンIIのみの発現株では，N/Cは変化せず，V/CとV/Nが増加することが報告されている（P.Greengard, 1991年）。また，我々の実験からは，ChATのみの発現株では上記観察量の全てが増加することを確認している。従って，NG108-15の形態変化にはシナプシンIIよりもChATの影響の方が強いことが示唆された。

一方，ChAT発現株では，細胞内外のACh濃度が高いことが，三澤らによって確認されている。そこで，次に外液ACh濃度の細胞形態への影響を調べるために，トランスフェクションしていないNG108-15を100 microM ACh添加のもとで培養した。その結果，N/Cは増え，V/Cは変化せず，従ってV/Nは減少した。この変化は，nicotinic receptorのアンタゴニスト（100 microM Hexamethonium chloride）により抑えられた。同様に，ChAT発現株においても，ACh receptorのアンタゴニストにより，N/Cは減る傾向を示した。

以上をまとめると，NG108-15では，nicotinic receptorを介した細胞外からのACh刺激により細胞あたりの突起数が増加し，細胞内でのChAT自身の何らかの働きによってバリコシティの数が増加することが示唆された。

Y.Yamane, T.Tojima, E.Ito, A.Yoshida, H.Misawa, T.Sugiyama,T.Yoshioka: Effects of expression of synapsin II and chorine acetyltransferase cDNA on the morphology of nerve cells

NII-Electronic Library Service