

日本産シビレイ*Narke japonica*電気器官神経終末からのアセチルコリン遊離に関与するカルシウムチャネルの薬理学的・免疫化学的特徴付け

得丸, 博史
九州大学薬学研究科製薬化学専攻

<https://doi.org/10.11501/3075412>

出版情報：九州大学，1993，博士（薬学），課程博士
バージョン：
権利関係：

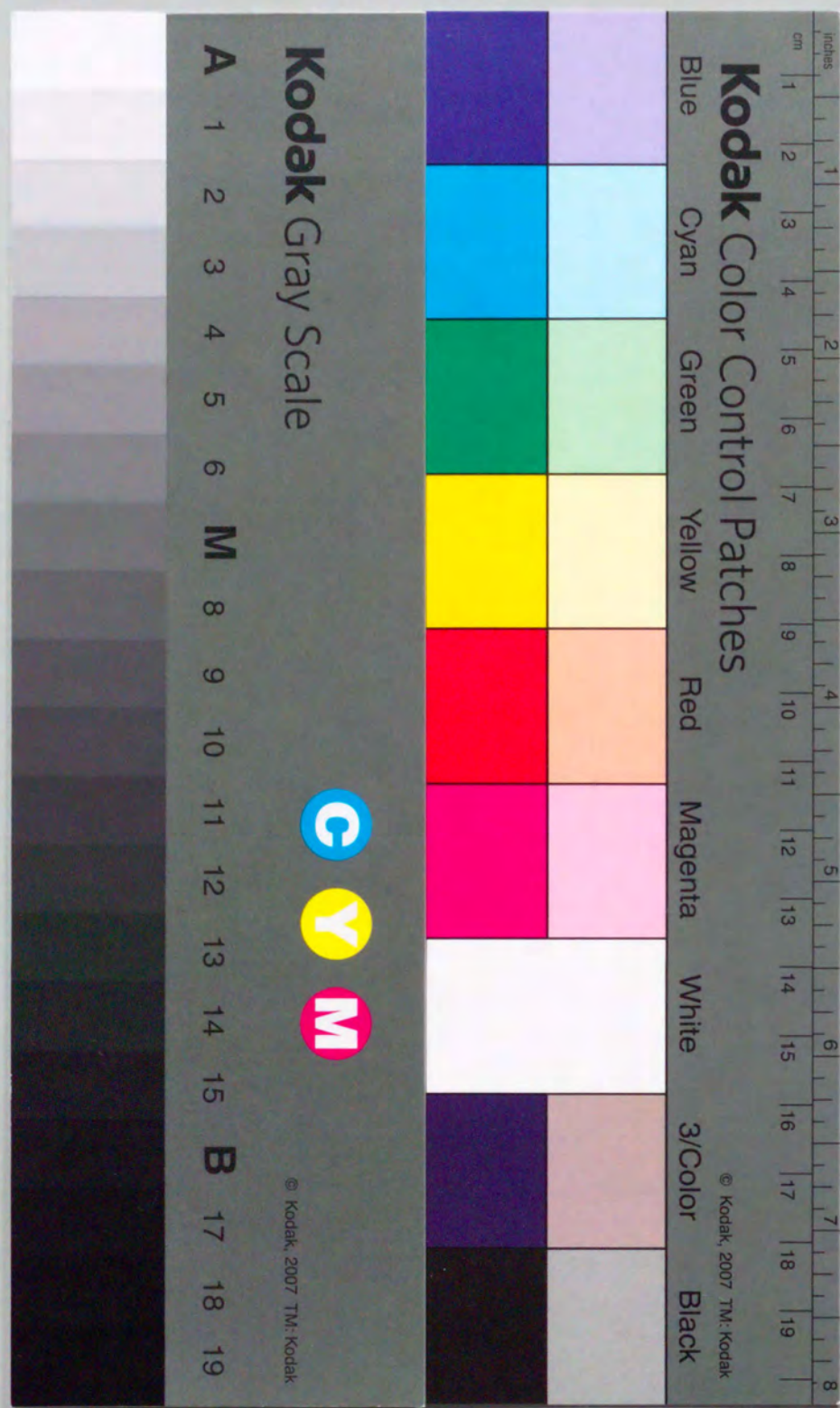


日本産シビレエイ *Narke japonica* 電気器官神経終末からの
アセチルコリン遊離に関するカルシウムチャネルの
薬理学的・免疫化学的特徴付け

1994

九州大学薬学部薬品物理化学

得丸 博史



日本産シビレエイ *Narke japonica* 電気器官神経終末からの
アセチルコリン遊離に関与するカルシウムチャネルの
薬理的・免疫化学的特徴付け

1994

九州大学薬学部薬品物理化学

得丸 博史

目次

第 1 章 序論

1. 1	はじめに	1
1. 2	神経細胞における電位感受性 Ca^{2+} チャネル	1
1. 3	神経終末からの伝達物質遊離に關与する Ca^{2+} チャネル	6
1. 4	シビレエイ電気器官神経終末	8
1. 5	シビレエイ電気器官を用いたシナプス伝達に関するこれまでの研究	8
1. 6	本研究の目的	10

第 2 章 実験の部

2. 1	実験材料及び試薬	11
2. 2	シビレエイ電気器官シナプトソームの調製	13
2. 3	化学発光を利用したシナプトソームからのACh定量法	15
2. 4	タンパク質の定量	18
2. 5	シナプトソームの電子顕微鏡標本作製法	18
2. 6	シナプトソーム形質膜の調製	19
2. 7	ω -CgTX結合量の測定	19
2. 8	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)	20
2. 9	ゲルのタンパク質染色	20
2. 10	化学架橋による ω -CgTX結合タンパク質の同定	20
2. 11	シナプトソーム形質膜の可溶化	21
2. 12	モノクローナル抗体MCC-1の調製	21
2. 13	免疫親和性カラムクロマトグラフィーを用いた Ca^{2+} チャネルの精製	22
2. 14	イムノブロットイング	22

第 3 章 結果の部

3. 1	電気器官シナプトソームおよびシナプトソーム形質膜の調製	24
3. 2	脱分極刺激によって遊離したAChの定量	26

3. 3	ACh遊離に対する ω -CgTXの効果	28
3. 4	ω -CgTX結合量の測定	30
3. 5	ω -CgTX結合タンパク質の同定	32
3. 6	ACh遊離に対するL型 Ca^{2+} チャネルブロッカーの効果	34
3. 7	ACh遊離に対する抗 Ca^{2+} チャネル抗体の効果	37
3. 8	シナプトソーム形質膜の可溶化及び免疫親和性カラムクロマト グラフィーを用いた Ca^{2+} チャネルの精製	39

第 4 章 考察の部

4. 1	伝達物質遊離に対する ω -CgTXの効果	42
4. 2	ω -CgTX結合量	43
4. 3	ω -CgTX結合タンパク質の同定	45
4. 4	伝達物質遊離に対するL型 Ca^{2+} チャネル阻害剤の効果	45
4. 5	シビレエイ電気器官神経終末の Ca^{2+} チャネル	46
4. 6	ACh遊離に対する抗 Ca^{2+} チャネル抗体の効果	47
4. 7	免疫親和性カラムクロマトグラフィーを用いた Ca^{2+} チャネルの精製	48
4. 8	シンタキシン	50

総括	51
----	----

引用文献	52
------	----

謝辞	62
----	----

ACh; acetylcholine
 ATP; adenosine 5'-triphosphate
 BCIP; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
 BSA; bovine serum albumin
 CHAPS; 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
 DHP; 1,4-dihydropyridine
 DMSO; dimethyl sulfoxide
 DSS; disuccinimidyl suberate
 DTT; dithiothreitol
 EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid
 FTX; funnel web spider toxin
 HEPES; N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid
 [^{125}I]- ω -CgTX; (3-[^{125}I]iodotyrosyl ^{22}) ω -CgTX
 kDa; kilodalton
 MPM; modified physiological medium
 NBT; nitro-blue tetrazolium
 nicardipine; 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid methyl 2-[methyl-(phenylmethyl)amino]ethyl ester
 ω -CmTX; ω -Conus magus toxin MVIC
 ω -CgTX; ω -Conus geographus toxin GVIA
 ω -Aga-IVA; ω -Agatoxin IVA
 PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis
 PMSF; phenylmethanesulfonyl fluoride
 PVDF; polyvinylidene difluoride
 SDS; sodium dodecyl sulfate
 TBS; tris buffered saline
 TBS-T; tris buffered saline-0.1%(V/V) Tween 20
 TPM; Torpedo physiological medium
 Tris; tris(hydroxymethyl)-aminomethane
 Tween 20; polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

1. 1 はじめに

神経終末からの神経伝達物質遊離には、シナプス前終末内の Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であり(Katz, 1969)、この Ca^{2+} 濃度の上昇は、形質膜に存在する電位感受性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の流入によって引き起こされる(Linas, 1982)(図. 1-1)。最近、神経終末部の電位感受性 Ca^{2+} チャンネルには様々な種類が存在することがわかり、各神経終末ごとに遊離に関与する Ca^{2+} チャンネルの種類が異なることがわかってきた(後述)。シナプス伝達は Ca^{2+} 濃度によってコントロールされていることから、 Ca^{2+} チャンネルが伝達物質の異なる各終末部における伝達を特徴付けていると思われる。神経伝達物質遊離機構を理解する上で、 Ca^{2+} チャンネルの分布やその性質及び構造を明らかにすることは極めて重要である。

1. 2 神経細胞における電位感受性 Ca^{2+} チャンネル

電位感受性 Ca^{2+} チャンネルは、その薬理学的性質と電気生理学的性質、そして組織分布から、T, N, L及びP型と呼ばれ区別されている(Nowycky et al, 1985; Bean, 1989; Tsien and Tsien, 1990; Miller and Fox, 1990; Llinas et al, 1989; Snutch and Reiner, 1992)。表. 1-1にその電気生理学的及び薬理学的性質を示した。ウサギ骨格筋L型 Ca^{2+} チャンネルは単離精製され(Curtis and Catterall, 1984)、そのサブユニット構造と各サブユニットの一次構造が明らかにされている(図. 1-2)。この Ca^{2+} チャンネルは、 α_1 (200-160 kDa), α_2 (150-135 kDa), β (65-50 kDa), γ (33-30 kDa), δ (27-24 kDa)の5つのサブユニットからなる複合体を形成し、 α_2 と δ はジスルフィド結合でつながっており、非還元条件下のSDS-PAGEでは、 α_1 とほぼ同じ分子量を示す。 α_1 サブユニットがイオン透過のポアを形成し、また、各種薬物及び毒物の作用部位を有する。最近、ウサギ脳より ω -CgTX感受性N型 Ca^{2+} チャンネルも単離精製され(McEnery et al, 1991; Witcher et al, 1993)、L型 Ca^{2+} チャンネルと類似した

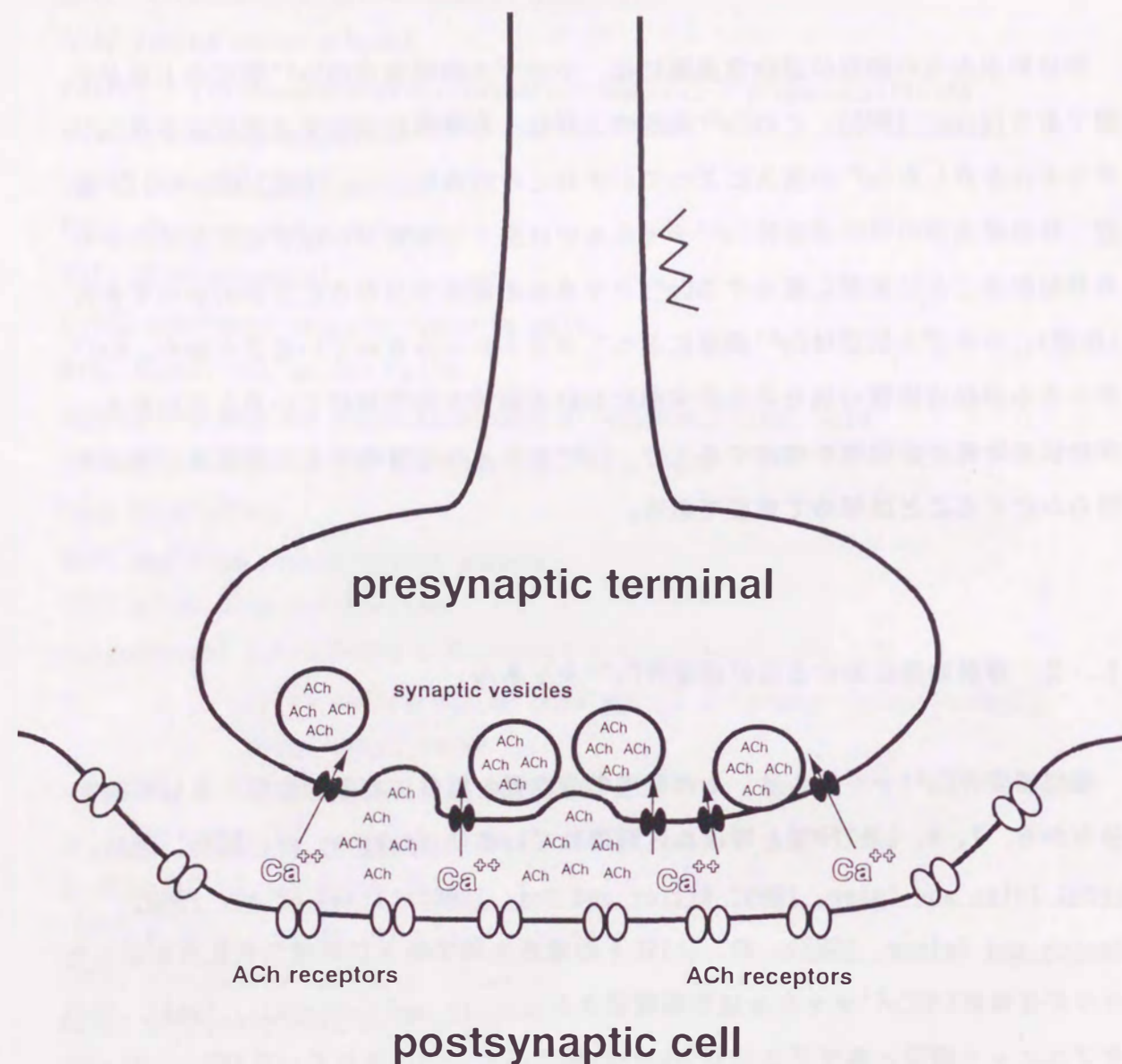


図. 1-1 神経伝達物質遊離の分子機構。神経筋接合部のような神経終末部からの伝達物質の遊離は、まず神経インパルスが終末部まで伝わり、これによってシナプス前膜が脱分極される。この脱分極により電位感受性Ca²⁺チャネルが活性化され、チャネルを介して細胞外からCa²⁺が流入する。流入したCa²⁺が何等かの生体内反応を引き起こした結果、シナプス小胞がシナプス前膜に融合し、小胞内伝達物質が細胞質に放出される。
このような機序はカエル神経筋接合部やヤリイカの巨大軸索など一部の標品を用いて電気生理学的に理解されている。

表. 1-1 脊椎動物電位感受性Ca²⁺チャネルの電気生理学的及び薬理学的性質。単一チャネルコンダクタンスは、110 mM Ba²⁺ (P型は80 mM) 中での値。P型は小脳のチャネル。活性化及び不活性化電位は、10 mM Ca²⁺中で、また、不活性化速度は0 mVで、10 mM Ca²⁺あるいはBa²⁺中で測定した(阿部輝雄, 1990)。

type	T	N	L	P
単一チャネル コンダクタンス	~8 pS	~13 pS	~25 pS	10~12 pS 20 pS
活性化電位	> -70 mV	> -20 mV	> -10 mV	> -60 mV
不活性化電位	-100~-60 mV	-120~30 mV	-60~-10 mV	
不活性化速度	速い $\tau = 20 \sim 50$ ms	中間 $\tau = 50 \sim 80$ ms	非常に遅い $\tau > 500$ ms	
ブロッカー		ω -CgTX	DHPs calciseptine	ω -AgaIVA FTX

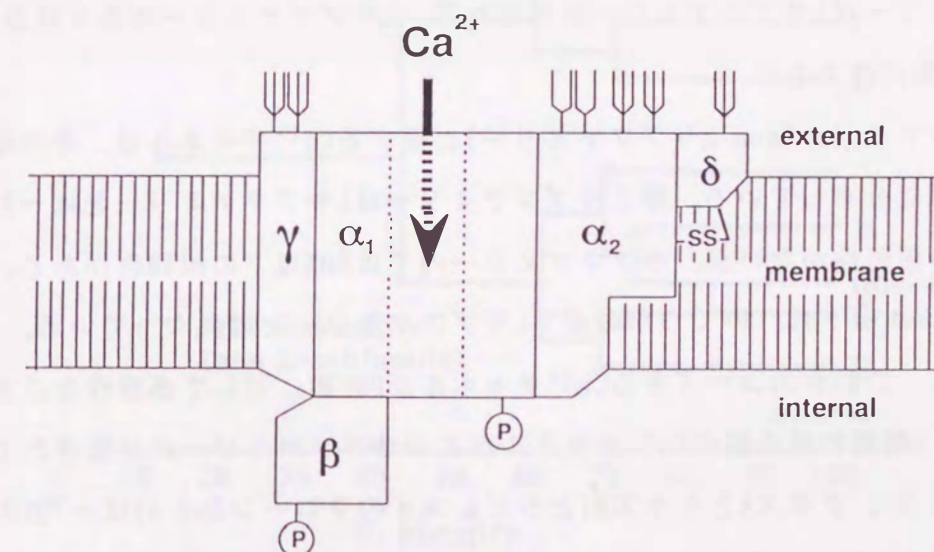


図. 1-2 タンパク質化学的研究から提出された骨格筋L型Ca²⁺チャネルの分子構造モデル。
Yは結合糖鎖を、ⓅはAキナーゼによってリン酸化を受ける部位を示している。各種Ca²⁺チャネル阻害剤に対する結合部位は、チャネル本体である α_1 サブユニットに存在する。 α_2 と δ は分子内ジスルフィド結合によって結合しており、非還元条件下のSDS-PAGEでは、 α_1 とほぼ同じ分子量を示す(Takahashi et al, 1987)。

サブユニット構造を有することが分かった。

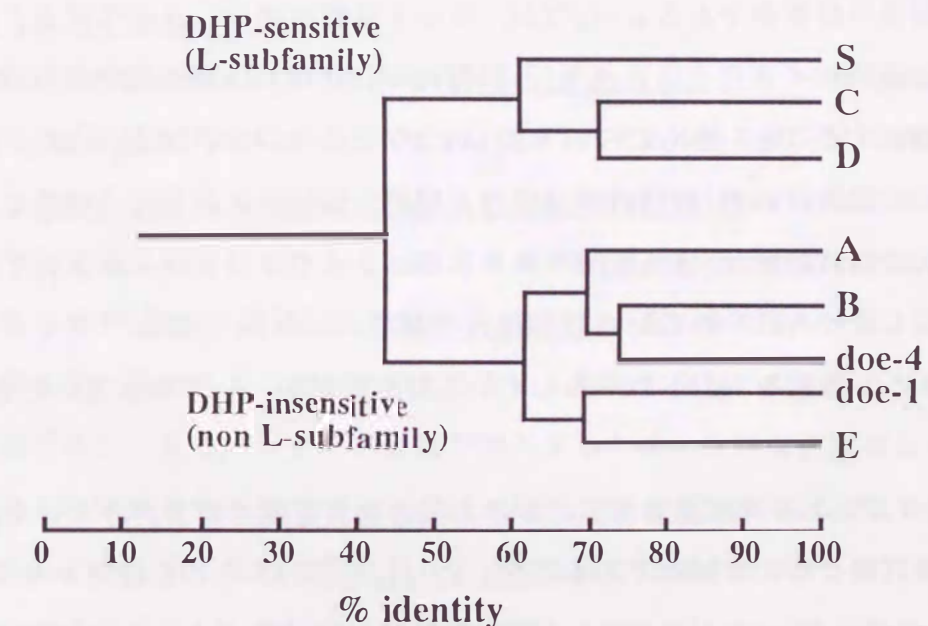
α_1 サブユニットは、この他多くの動物種及び組織からクローニングされており、その一次構造に基づいて6種類に分類されている。また、それらをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、その薬理学的性質が調べられた。その結果、 α_1 サブユニットの一次構造の分類と薬理学的性質に基づく分類は表、1-2に示すような対応関係にあることが示されている(Tsien et al, 1991; Catterall and Striessnig, 1992; Snutch and Reiner, 1992)。即ち、これまでにシーケンスが決定され、発現実験が行われている哺乳類 Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニットは6種類に分類されている。 α_1 サブユニットに対する呼び方は研究者によって様々である。

Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニット間の系統的関係を図、1-3に示す。樹系図はシーケンスの相同性を基にしたものであるが、機能的な違いも示しているようにも思われる。樹系図は、Snutchの用語法に従って表示した。チャネルは二つの大きなサブファミリーに分類される。第一のサブファミリーは、 α_{1s} (骨格筋)、 α_{1c} (心筋、平滑筋、神経系)、 α_{1d} (神経分泌細胞)の三つの α_1 遺伝子からなる。これらの遺伝子から発現した Ca^{2+} チャネルは、DHPアゴニスト及びアンタゴニストに明確な応答を示し、L型 Ca^{2+} チャネルに当てはまるその他の機能的特徴を示す。このような理由から、このサブファミリーはLサブファミリーと呼ばれる。Lサブファミリーの各々はお互いに60~70%の相同性をもつ。

第二のサブファミリー(non-Lサブファミリー)に属する Ca^{2+} チャネルは、そのほとんどが神経組織に分布している。第二サブファミリーはLサブファミリーとは~40%しかアミノ酸の相同性がないが、サブファミリー内では60%以上の相同性がある。これらの α_1 サブユニットは、いくつかの点でLサブファミリーとは異なっている。最も顕著なことは、これらのコードする Ca^{2+} チャネルがDHP類に対して感受性を示さないことである。3種類の哺乳類の Ca^{2+} チャネルがこのサブファミリーに分類されている(クラスA, B, E)。クラスAとクラスB(とシビレエイのクローンdoe-4)は~70%の相同性があり、近縁であるように思われる。クラスBのcDNAは ω -CgTX感受性であり、DHPに非感受性のN型 Ca^{2+} チャネルをコードする。 α_{1A} サブユニットは小脳プルキンエ細胞や granuleニューロンに高密度に発現しており(Mori et al, 1991)、その組織分布から最初P型 Ca^{2+} チャネルをコードすると考えられていたが、この遺伝子から発現した Ca^{2+} チャネルは、nativeなものとP型 Ca^{2+} チャネルブロッカーに対する薬理

表、1-2 哺乳類 Ca^{2+} チャネル α_1 サブユニットの分類(Zhang et al, 1993)。

Snutch class	Perez-Reyes CaCh	Tanabe, Numa clone	Functional class	Blockers	Primary tissue location
A	4	BI	P?, Q	ω -Aga-IVA	neuronal
B	5	BIII	N	ω -CgTX	neuronal
C	2	CARD	L	DHPs	cardiac
D	3	-	L	DHPs ω -CgTX	neuronal endocrine
E	[6]	BII	R		neuronal
S	1	CAC6	L	DHPs	skeletal



図、1-3 アミノ酸配列の相同性を基に分類した Ca^{2+} チャネル α_1 サブユニットの関係。A~E及びSは、Snutchの命名法にしたがった α_1 サブユニットのクラス。doe-1とdoe-4はシビレエイDiscopyge ommataよりクローニングした α_1 サブユニット遺伝子を示す(Zhang et al, 1993)。

学的性質に違いがみられ(クラスAから発現したCa²⁺電流は、 ω -Aga-IVAに対する感受性が ~ 100 倍低く、 ω -CmTX MVIIICに対する感受性は ~ 10 倍高い)、クラスA遺伝子がP型Ca²⁺チャネルをコードしているかどうかは疑問視されている。RandallらはクラスAがコードするCa²⁺チャネルをQ型という呼び方で区別している(Randall et al, 1993)。また、クラスEの遺伝子は他のクラスと異なり、低閾値で活性化されるCa²⁺チャネルをコードする(Niidome et al, 1992; Soong et al, 1993)。クラスEから発現したCa²⁺チャネル電流は、RandallらによってR型と呼ばれ電気生理学的に区別されている。

1. 3 神経終末からの伝達物質遊離に関与するCa²⁺チャネル

電位感受性Ca²⁺チャネルのうち、N型Ca²⁺チャネルは神経系に特異的に分布し、実際に脊髄神経節細胞ではN型Ca²⁺チャネルが大多数を占めている。そしてN型Ca²⁺チャネルの特異的阻害剤である ω -CgTXが、ラット交感神経(Hirning et al, 1988)及びウサギ海馬スライス(Dooley et al, 1988)からの[³H]ノルエピネフリンの遊離を部分的に阻害すること、さらにラット脳シナプトソームへの⁴⁵Ca流入が ω -CgTXによって部分的に阻害される(Reynolds et al, 1986; Suszkiw et al, 1989)ことなどから、神経伝達物質遊離は主にN型Ca²⁺チャネルによってコントロールされているという考えが広く受け入れられていた(Miller, 1987)。しかし、N型Ca²⁺チャネル以外のCa²⁺チャネルが遊離をコントロールしている神経組織が、いくつか見いだされている。

ω -CgTXは、カエル神経筋接合部における伝達物質遊離の阻害には有効であるが、マウス神経筋接合部には無効である(Sano et al, 1987)。この伝達はクサグモの1種 *Agelenopsis aperta* 由来の毒素の1つFTXによって阻害されることからP型Ca²⁺チャネルの関与が示唆されている(Uchitel et al, 1992)。また、ラット脳下垂体後葉からのホルモン分泌は、2種類のCa²⁺チャネル(L型とN型)によってコントロールされていることが明らかになった(Cazalis et al, 1987; Lemos and Nowycky, 1989; Wang et al, 1992)。さらに、最近Turnerらは、ラット線条ニューロンのドパミンの遊離はP型とN型の2種類のCa²⁺チャネルが関与していること、そしてグルタミン酸の

遊離には、P型チャネルと、 ω -CgTXにも ω -Aga-IVAにも感受性を示さないCa²⁺チャネルが関与することを明らかにしている(Turner et al, 1993)。ヒヨコ毛様体神経節シナプス前膜におけるCa²⁺電流の大部分は ω -CgTX感受性であるが、1割はDHPにも ω -CgTXにも非感受性のものがある(Yawo et al, 1993)。キンギョ網膜双極細胞の軸索終末部からのグルタミン酸遊離(Tachibana et al, 1993)や培養したヒヨコ後根神経節細胞からのサブスタンスPの遊離(Holz et al, 1988)は、L型Ca²⁺チャネルによってその遊離がコントロールされている。さらに、L型Ca²⁺チャネルに対する抗体を用いたラット脳の免疫細胞化学の実験から、L型Ca²⁺チャネルが、比較的低い密度ではあるが、シナプス前神経終末に存在することが示されている(Ahlijanian et al, 1990)。L型Ca²⁺チャネルは生理的条件下のほとんどの中枢神経系シナプスにおける伝達物質遊離に関して、二次的な役割を果たしていると考えられている。

このように、伝達物質が異なる終末ごとにその遊離をコントロールするCa²⁺チャネルの種類や性質が異なることが明らかにされつつあり、さらに様々な種類の伝達物質について、その遊離をコントロールするCa²⁺チャネルの分布及びその特徴付けを行う必要がある。

神経伝達物質遊離のための分子装置(Ca²⁺チャネルを含む)の構造を解明し、遊離のメカニズムを明らかにするためには、Ca²⁺チャネルを初めとする関連タンパク質分子とそれらが構成する超分子構造体の生化学的特徴付けが必須であろう。さらに、生理学的実験を平行して行うことのできる実験系が重要であると考えられる。哺乳類(ラットやウサギ)脳より調製した神経終末単離標品(脳シナプトソーム)は種々の神経伝達物質を含む神経終末の混合物であるため、生化学実験に対応した生理学的実験が不可能であり、また、シナプス後膜が混入するため、純粋な前膜標品が得られないなど多くの問題点を持っている。これに対し、巨大神経終末は、電気生理学的研究には有用であるが、量的な問題から生化学実験には適さない。

以上の点を考慮し、本研究では実験材料としてシビレイ電気器官シナプトソームを用いることにした。シビレイ電気器官からは生化学実験に必要なシナプトソームを大量に得ることができ、さらに伝達物質に関して均一な神経終末を高密度に含むため、生化学実験と生理学的実験を対応させることが可能である。また、電気器官のシナプス間隙(60 nm)は脳シナプスの間隙(20 nm)よりも広いため、シナプトソーム標品中にシナプス後膜の混入が少なく、純粋なシナプス前膜標品を得ること

も可能である。

このようにシビレエイ電気器官は神経伝達物質遊離メカニズムの解明には、極めて有利な実験材料である。

1. 4 シビレエイ電気器官神経終末

シビレエイ(図. 1-4A)は、デンキエイとも呼ばれ、その名が示すように餌の捕獲のため、あるいは外敵に対する防御手段としてその体盤の両側の腎臓型の発電器官により放電を起こす。この電気器官は発生学的に筋肉に由来するものであり、そこに来る神経終末はコリン作動性の単一種である。シビレエイには多数の種が存在し、外形は類似しているがその大きさは様々である。日本産シビレエイ *Narke japonica* は、体長30 cmほどで、外国産シビレエイ *Torpedo marmorata* や、*Dyscophye ommata* に比べかなり小さい。電気器官は、約400個の電板細胞が背側から腹側に筒状に重なった電板筒500個(両側で1000個)が蜂の巣構造をとる。電気葉細胞(electric lobe)に細胞体をもつ運動神経は、長い軸索を経て各電板細胞の間にシナプスを形成している(図. 1-4B)。

1. 5 シビレエイ電気器官を用いたシナプス伝達に関するこれまでの研究

シビレエイ電気器官シナプトソームを用いた伝達物質放出機構に関する研究は多くの研究者によって行われている。シビレエイ電気器官神経終末には、 ω -CgTX感受性の Ca^{2+} チャネルの存在が示唆されている。また、 ω -CgTX感受性以外の Ca^{2+} 流入の存在も示唆されている。Moulianらは、*Torpedo*シナプトソームからのACh遊離に対するクサグモの1種 *Agelenopsis aperta* の毒液、及びそれより精製した毒素の1つFTXの効果を調べることによって、P型 Ca^{2+} チャネルの存在を示唆している(Moulian and Gaudry-Talarmain, 1993)。

分子生物学的解析も行われている。Horneらは、*Dyscophye ommata* より、数種類の Ca^{2+} チャネル α_1 サブユニット遺伝子をクローニングした(Horne et al, 1993)。そ

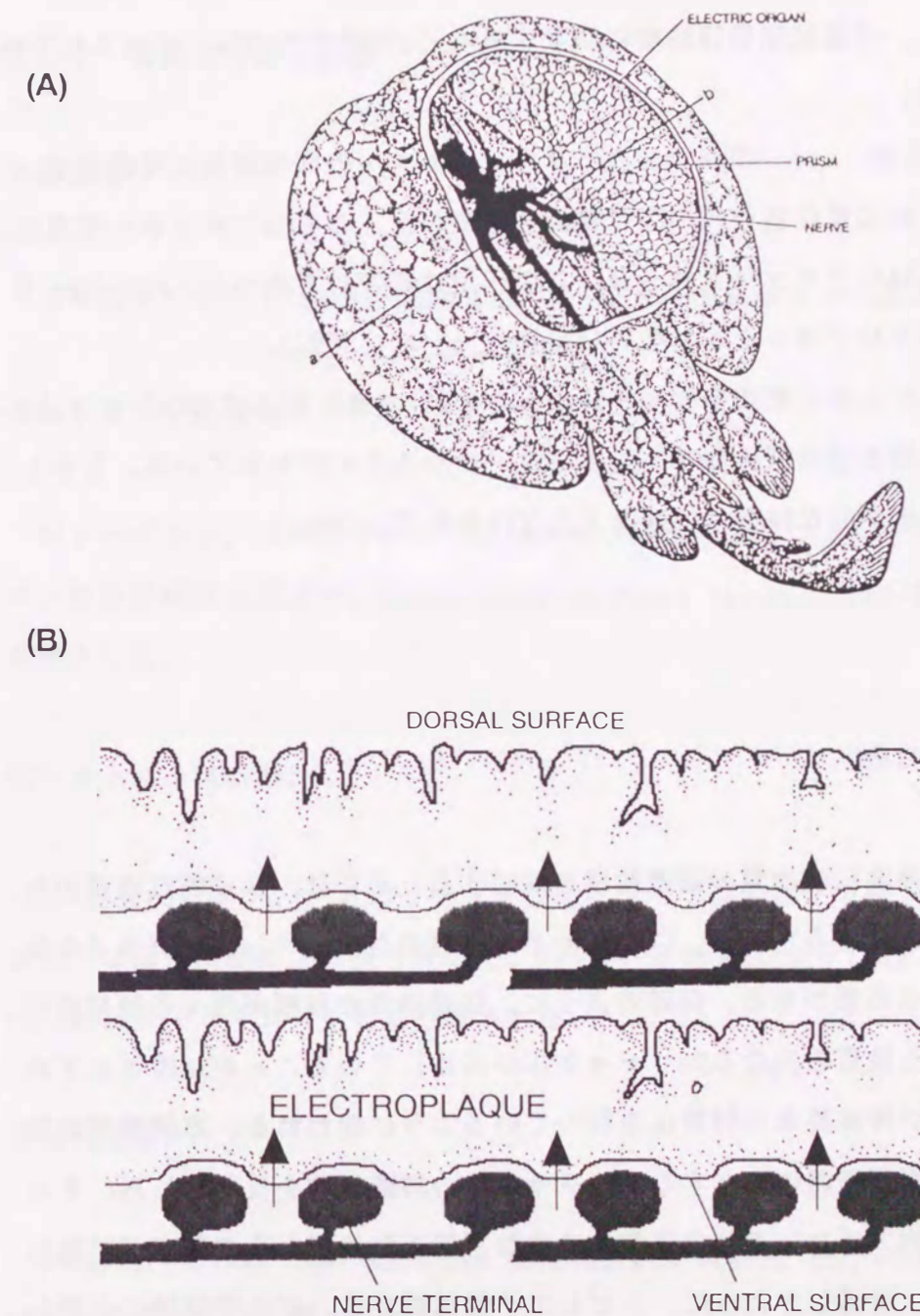


図. 1-4 シビレエイ及びシビレエイ電気器官。
(A)シビレエイ (B)A図のa-b線で切断し、横からみた図。矢印は電流の向きを示す。

のうち、doe-2のcDNAはDHP感受性L型Ca²⁺チャネルのものに類似し、doe-1とdoe-4はDHP非感受性のnon-Lサブファミリーのものに類似していた。doe-1とdoe-4は、各々前脳及び電気葉細胞(electric lobe)に主に発現していることから、彼らはdoe-4が神経終末に局在し、神経伝達物質遊離に関与する ω -CgTX感受性のCa²⁺チャネルであると予想している。

最近、Ellinorらは、doe-1のmRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、高閾値で活性化される電位依存性のCa²⁺電流を観察した。このCa²⁺チャネル電流は、 μ Mレベルの ω -CgTXにブロックされるが、この作用は可逆的であった。doe-1は、DHP及び ω -Aga-IVAではブロックされない(Ellinor et al, 1993)。

このように、シビレエイ電気器官神経終末からのACh遊離に関与するCa²⁺チャネルの研究は、薬理学的及び分子生物学的なアプローチから主に行われている。しかし、Ca²⁺チャネルの生化学的な特徴付けはほとんど行われていない。

1. 6 本研究の目的

神経終末からの神経伝達物質の遊離機構を解明するためには、伝達物質遊離のための分子装置の構造を明らかにし、Ca²⁺チャネルを含めた関連タンパク質分子を生化学的に特徴付ける必要がある。前述のように、伝達物質の種類が異なる神経終末にはそれに対応した性質の異なるCa²⁺チャネルが局在していることが示唆されており、Ca²⁺チャネルが神経終末の特徴化を行っているように思われる。本研究では神経終末からの伝達物質遊離に関与するCa²⁺チャネルの特徴付けを目的とした。そのためには、薬理学的アプローチや生化学的手法など様々な角度からの研究が可能な標品が必要である。前述したように、シビレエイ電気器官は、生化学実験に必要な神経終末標品を大量に得ることができ、さらに伝達物質に関して均一な神経終末を高密度に含むため、生化学実験と生理学的実験を同時に行うことができる。

本研究では、シビレエイ電気器官を用い、その神経終末からのAChの遊離機構を解明するために、この機構の中心となるCa²⁺チャネルの特徴付けを行うことを目的とした。

第 2 章 実験の部

2. 1 実験材料及び試薬

実験動物:

日本産シビレエイ (*Narke japonica*) は、志賀島漁協組合から購入した。

プロテアーゼ阻害剤:

ロイペプチン、ペプスタチン A はペプチド研究所より、ベンザミジン、アプロチニン は和光純薬工業より、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) はシグマ社より各々購入した。

Ca²⁺チャネル阻害剤:

ω -conotoxin GVIA, カルシセプチンはペプチド研究所より購入した。塩酸ニカルジピンは山之内製薬より譲り受けた。[¹²⁵I]- ω -conotoxin GVIA (10 μ Ci, 2200 Ci/mmol) は、アマシャム社より購入した。

界面活性剤:

polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)、生化学用ジギトニンは和光純薬工業より購入した。

化学発光用試薬:

horseradish peroxidase, ルミノール, アセチルコリンクロライドはシグマ社より購入した。コリン・オキシダーゼはフナコシより購入した。

タンパク質研究用電気泳動試薬及びブロッティング試薬:

電気泳動用ポリアクリルアミド既製ゲル(SPG-526L)は、アトー化学機器より購入した。プロテイン・ブロッティング検出キット(ビオチン化二次抗体, ストレプトアビジン・アルカリホスファターゼ, NBT, BCIPを含むマウス及びウサギIgG用)は、アマシャム社より購入した。PVDF膜(Immobilon-P)は、ミリポア社より購入した。

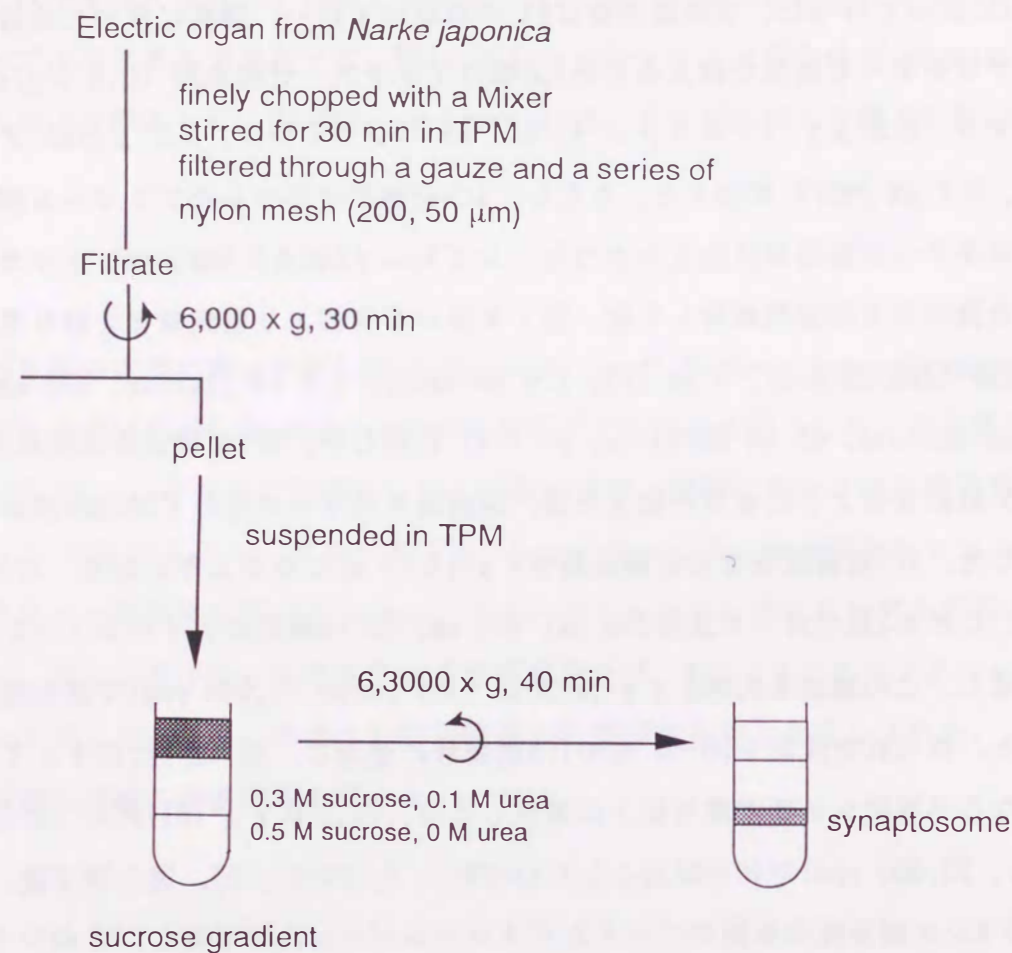
その他:

タンパク質の定量に用いたBCA(bicinchoninic acid) Protein Assay Reagent及び、架橋剤であるDSS(disuccinimidyl suberate)はピアス社より購入した。牛血清アルブミン(BSA)は、シグマ社より購入した。試料の透析・濃縮に用いた限外濾過装置セントリコン-30はアミコン・グレースジャパンより購入した。免疫親和性カラムクロマトグラフィーの作製に用いたHiTrapアフィニティーカラムはファルマシア社より購入した。抗シンタキシン抗体を含むウサギ血清及び、MCC-1マウスモノクローン抗体産生ハイブリドーマは、新潟大学脳研究所の阿部輝雄先生より恵与された。

他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

2. 2 シビレエイ電気器官シナプトソームの調製

シビレエイ電気器官シナプトソームの調製は、Israelらの方法(Israel et al., 1984)に従って行った。全調製過程は4℃の低温で行い、調製に用いた全緩衝液には、プロテアーゼ活性を抑えるために5種のプロテアーゼ阻害剤 (0.5 μ g/ml ロイペプチン, 0.5 μ M ペプスタチン A, 0.1 mM ベンザミジン, 0.5 μ g/ml アプロチニン, 0.1 mM PMSF) を加えた。ただし、ACh遊離測定用のシナプトソーム調製時にはプロテアーゼ阻害剤は加えなかった。シビレエイ5匹を0.03%(W/V) トリカインを加えた海水中で30分間麻酔した後、包丁を用いて背部より電気器官を取り出し、TPM緩衝液 (280 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 300 mM urea, 100 mM sucrose, 40 mM HEPES/Na, pH 7.4) に浸した。TPM緩衝液を電気器官1 g当たり1.5 mlになるようにさらに加えた後、家庭用ミキサーを用いて5秒間5回ホモジナイズした。TPM緩衝液をさらに電気器官1 g当たり10 mlになるように加え、30分間攪拌した。これを2重のガーゼ及び200 nm, 200 nm, 50 nm細孔のナイロンメッシュで順次濾過し、この濾液を6,000 x g (KUBOTA RA-7 rotor, 7,000 rpm)で20分間遠心処理した。得られた沈澱を50-60 mlのTPM緩衝液に懸濁し、図. 2-1に示すような組成からなる不連続ショ糖密度勾配上に層積した後、63,000 x g (HITACHI SRP28SA rotor, 22,000 rpm)で40分間遠心した(ACCEL., 5, BRAKE, 5)。遠心終了後、0.3 Mと0.5 Mショ糖密度の界面のバンドをパスツールピペットで分取し、このシナプトソーム画分を101,000 x g (HITACHI RP-42, 36,000 rpm)で1時間遠心し、沈澱として回収した。得られた沈澱(シナプトソーム)は、mTPM緩衝液 (285.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 50 mM urea, 400 mM sucrose, 40 mM HEPES/Na, pH 7.4)に懸濁し、ACh遊離測定の実験及びシナプトソーム形質膜の調製に用いた。



Torpedo Physiological Medium; TPM

280 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose,
300 mM urea, 100 mM sucrose, 40 mM Hepes/Na, pH 7.4

modified Torpedo Physiological Medium; mTPM

285.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose,
50 mM urea, 400 mM sucrose, 40 mM Hepes/Na, pH 7.4

図. 2-1 シビレイ電気器官シナプトソームの調製法。

2. 3 化学発光法を利用したシナプトソームからのACh定量法

化学発光を利用したAChの定量は、Israelらの方法(Israel and Lesbats, 1981)及びSchweitzerの方法(Schweitzer, 1987)を一部改変した。化学発光法の原理は図. 2-2に示した。具体的な定量操作法は図. 2-3に詳しく示した。ACh定量には、以下の3種類のTPM緩衝液を用いた。

mTPM; シナプトソーム懸濁用 ($-Ca^{2+}$)

285.1 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.8 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, 50 mM urea,
400 mM sucrose, 40 mM HEPES/Na, pH 7.4

TPM(1); インキュベート用 ($+Ca^{2+}$) 2倍希釈で使用

557.4 mM NaCl, 6.0 mM KCl, 3.6 mM $MgCl_2$, 8.5 mM $CaCl_2$, 11.0 mM glucose,
100 mM urea, 800 mM sucrose, 80 mM HEPES/Na, pH 7.4

TPM(2); 脱分極刺激用 (高KCl濃度) 2倍希釈で使用

75.0 mM NaCl, 491.0 mM KCl, 3.6 mM $MgCl_2$, 6.8 mM $CaCl_2$, 11.0 mM glucose,
100 mM urea, 800 mM sucrose, 80 mM HEPES/Na, pH 7.4

2. 2で調製したシナプトソームを、化学発光系酵素群 (コリンオキシダーゼ, パーオキシダーゼ, ルミノール) 及び Ca^{2+} チャネル阻害剤を含むTPM中に加えて150 μ lにし、25°Cで10分間プレインキュベートした。脱分極刺激はシリンジを用いて、高濃度のKClを含むTPMを100 μ l加えることによって行った。この刺激により、外液のKCl濃度が3 mMから100 mMに変化した。この K^+ 濃度の増加分、NaCl濃度を280 mMから183 mMに減少させることによって脱分極刺激前後で浸透圧が変化しないように調整した。化学発光量の定量は、Lumi counter 1000 DIGITAL PHOTOMETER (日音医理科器械製作所)で行い、測定終了後、50 pmol AChをシリンジで加えて発光させ、記録曲線下の面積を比較することによって遊離されたAChを定量した。

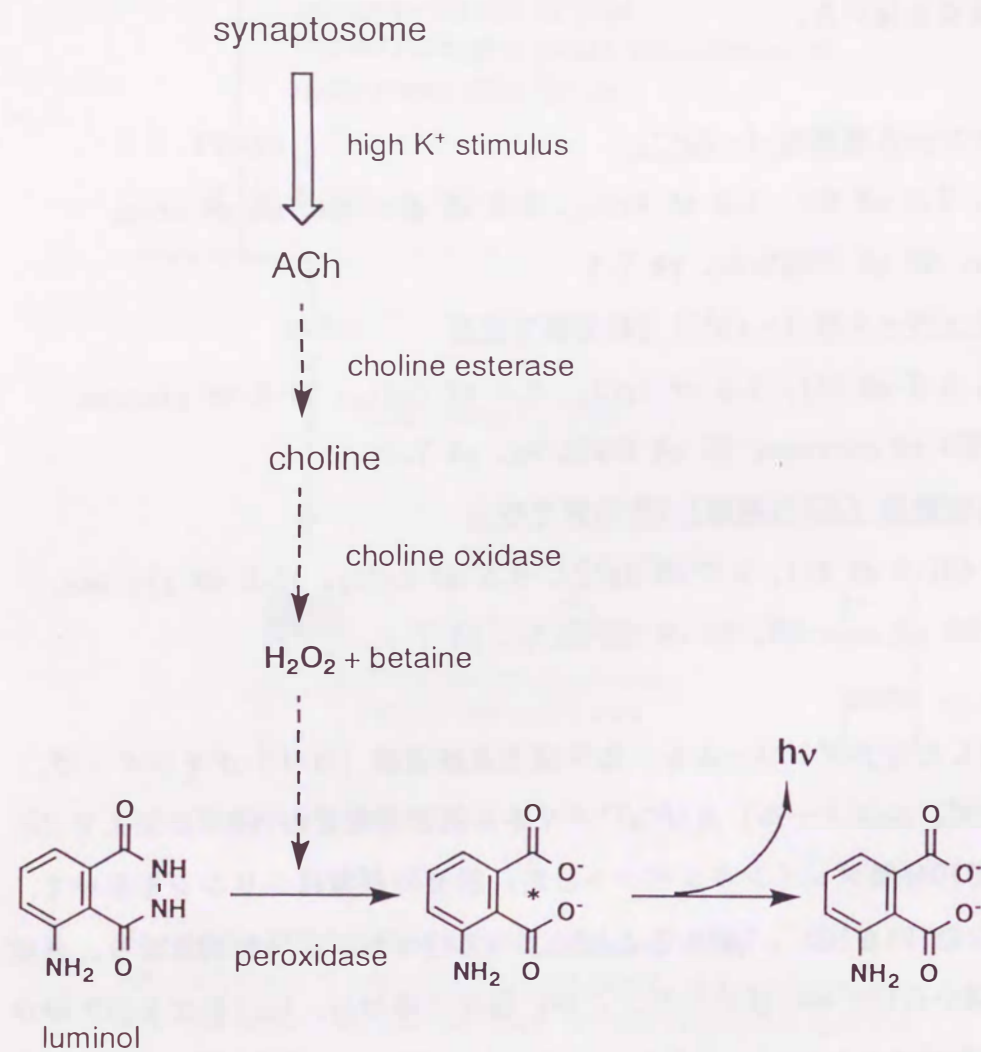
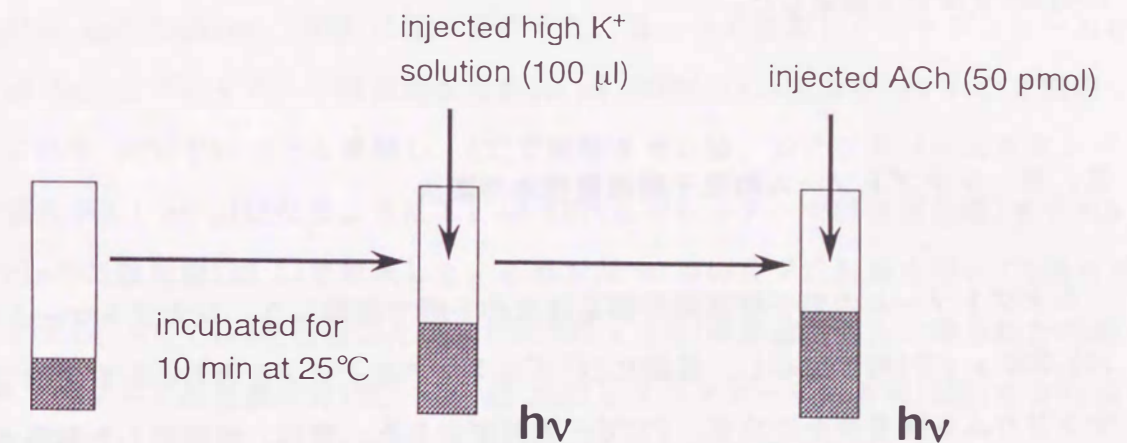


図. 2-2 化学発光を利用したAChの定量の原理。 シナプトソームから遊離したAChは、内在性のコリンエステラーゼによってコリンに分解される。このコリンから、コリンオキシダーゼによりベタイン及び過酸化水素が生じる。過酸化水素とルミノールがパーオキシダーゼによりフタル酸ジアニオンの励起状態を生じ、これから光が放射される。



[操作手順]

- ① ガラス製セルに、コリンオキシダーゼ溶液(100 mg/ml)5 μ l, パーオキシダーゼ溶液(1 mg/ml)5 μ l, ルミノール溶液(1 mM)15 μ l, TPM(1)緩衝液60 μ l, Ca^{2+} チャネル阻害剤(あるいは抗 Ca^{2+} チャネル抗体)を含むdistilled water35 μ lを入れ、これに濁シナプトソーム懸濁液30 μ lを加えて全量を150 μ lとし、25°Cで10分間インキュベートした。
- ② セルをLumicounter 1000 DIGITAL PHOTOMETERにセットした。以下の発光測定は室温で行った。
- ③ TPM(2)緩衝液50 μ l, Ca^{2+} チャネル阻害剤(あるいは抗 Ca^{2+} チャネル抗体)を含むdistilled water50 μ lからなる高 K^+ 脱分極用溶液をシリンジでインジェクトし、遊離したAChによって起こる発光を測定した。高 K^+ 刺激前後での Ca^{2+} チャネル阻害剤(あるいは抗 Ca^{2+} チャネル抗体)の濃度変化はないようにした。
- ④ 発光終了後、50 pmolのAChをインジェクトし、発光を測定した。

図. 2-3 化学発光法によるシナプトソームからの遊離AChの定量法。
KClの濃度変化によって起こる刺激前後の浸透圧変化は、NaClによって調整した。

2. 4 タンパク質の定量

牛血清アルブミン(BSA)を標準タンパク質として、ピアス社のBCA Protein Assay Reagentを用いて測定した。

2. 5 シナプトソームの電子顕微鏡標本作製法

シナプトソームの電子顕微鏡用標品は次の手順で調製した。シナプトソームを、101,000 x gで1時間遠心し、沈澱に2% グルタルアルデヒドを含む0.5 M カコジル酸ナトリウムをゆるやかに注ぎ、4℃で一晩前固定した。翌日、前固定した試料を手術用メスを用いて、静かにはぎ取り、上清を捨ててもう一度新しい2% グルタルアルデヒドを含む0.5 M カコジル酸ナトリウムを注いで、1時間程放置した。この沈澱を50 mM リン酸緩衝液で10分間隔で3回洗浄した。次に1% オスミウム酸を含むリン酸緩衝液に浸し、4℃で2時間固定した。50%, 70%, 90% エタノールの順に浸した後、4℃から徐々に室温に戻し、最後に100% エタノールで脱水した(10分 x 3)。脱水した試料は、酸化プロピレンオキシドに浸し、EPON : 酸化プロピレンオキシド = 1 : 1からなる溶液に浸し、1時間浸透した後、100% EPON樹脂を浸透させた。包埋された試料は、ダイヤモンドナイフで切断、超薄切片とし、グリッド上で酢酸ウラン及びクエン酸鉛で二重染色した。調製した電子顕微鏡用標品は、日本電子製のJEM 1200 EXで観察・撮影した。

2. 6 シナプトソーム形質膜の調製

シビレイ電気器官シナプトソーム形質膜の調製は、StadlerとTashiroの方法(Stadler and Tashiro, 1979)に従って行った。2. 2で調製したシナプトソームを、150 mM NaClとプロテアーゼ阻害剤を含む20 mM HEPES/Tris緩衝液(pH 7.4)で懸濁した。これを-20℃でいったん凍結し、4℃で融解させた後、シナプトソームをタンパク質濃度が0.1 mg/mlになるように0.1 mM EDTAとプロテアーゼ阻害剤(5種)を含む5 mM Tris/HCl緩衝液(pH 8)で希釈した。これを30 ml用の皮下注射器を用いて5回ホモジナイズし、4℃で1時間放置した後、105,000 x gで1時間遠心した。得られた沈澱(シナプトソーム形質膜画分)は、150 mM NaClとプロテアーゼ阻害剤(5種)を含む10 mM HEPES/Tris (pH 7.4) (緩衝液 A) に懸濁し、-80℃で凍結保存した。

2. 7 ω -CgTX結合量の測定

シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜に対する ω -CgTXの結合は、(3-[^{125} I]iodotyrosyl ^{22}) ω -conotoxin GVIA ([^{125} I] ω -CgTX)を用いて、AhmadとMiljanichの方法(Ahmad et al, 1988)に従って行った。シナプトソーム100 μ g proteinあるいはシナプトソーム形質膜20 μ g proteinを含む50 μ lのMPM緩衝液(280 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM MgCl $_2$, 3.4 mM CaCl $_2$, 5.5 mM glucose, 50 mM urea, 400 mM sucrose, 40 mM HEPES/Na, pH 7.4)に、0.265から13.24 μ Mの範囲で濃度を変えて[^{125} I]- ω -CgTX (55 mCi/mmol)溶液 50 μ lを加え、25℃で2時間インキュベートした。1%(W/V) BSAを含む氷冷MPM緩衝液(0.8 ml)を加えた後、減圧下でガラス繊維濾紙(Whatman GF/B)を通して急速濾過し、氷冷したMPM緩衝液(2 ml)で5回濾紙を洗浄することにより結合したリガンドと非結合型リガンドを分離した。ガラス濾紙上の放射能は、 γ -カウンター(アロカ ARC-360)を用いて測定した。膜あるいは濾紙への非特異的吸着量は、過剰の非放射性 ω -CgTX(200 μ M)存在下であらかじめ25℃で1時間インキュベートしたものについて同様に[^{125} I]- ω -CgTXを加えて測定した。特異的結合は、全結合量から非特異的な吸着量を差し引いたものとした。

2. 8 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

スラブ電気泳動は、Laemmliの方法(Laemmli, 1970)に従って0.1% SDSを含む5-20% 密度勾配のアクリルアミド濃度ゲル(アトー化学機器, SPG-520Lパジェル)を用い、泳動は20 mAの定電流で行った。試料の可溶化は、試料溶液に同容量の可溶化緩衝液(40 mM Tris/HCl, pH 7.6, 4% SDS, 16 mM EDTA, 20% glycerol, 0.005% BPB)を加え、100℃, 3分間加熱して行った。さらに、試料を還元する場合は、試料体積の6分の1の20 mM DTTを加えて同様の操作により行った。分子量マーカーには、ミオシン(212 kDa), α_2 -マクログロブリン(170 kDa), β -ガラクトシダーゼ(116 kDa), トランスフェリン(76 kDa), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(53 kDa)を含む高分子量SDSキャリブレーションキット(ファルマシア社)を用いた。

2. 9 ゲルのタンパク質染色

SDS-PAGE終了後のゲルのタンパク質の染色は銀染色で行った。銀染色には、第一化学薬品のキット(2D-銀染色試薬・II「第一」)を用いた。

2. 10 化学架橋法による ω -CgTX結合タンパク質の同定

シナプトソーム形質膜(25 μ g protein/40 μ l MPM緩衝液)に、2.5 μ Mあるいは5 μ Mの $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega\text{-CgTX}$ (55 mCi/mmol, in MPM緩衝液)を40 μ l加え(最終濃度が各々1.25及び2.5 μ M)、25℃で90分間インキュベートした。これに20分の1容の架橋剤DSS(in DMSO)を最終濃度が0.03, 0.3あるいは3 mMになるように加え、25℃で15-60分間インキュベートした。100 mM Tris/HCl緩衝液(pH 8.5)で反応を停止し、これを遠心10,000 $\times$ gで30分間遠心し、沈澱をMPM緩衝液で懸濁した。この遠心・懸濁の操作を再び繰り返した後、最終的な沈澱をSDS-PAGE用の可溶化剤で25℃, 30分間あるいは100℃, 3分間可溶化し、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE終了後、ゲルをゲル乾燥器により乾燥させた。乾燥させたゲルは、富士フィルムのバイオイメージアナライ

ザーを用いてオートラジオグラフィーを行った。

2. 11 シナプトソーム形質膜の可溶化

緩衝液Aに懸濁したシナプス前膜(3-5 mg protein/ml)に、同容量の2%(W/V)ジギトニン、150 mM NaCl及びプロテアーゼ阻害剤(5種)を含む10 mM HEPES/Tris緩衝液(pH 7.4)を加え、4℃で30分間緩やかに攪拌した後、101,000 $\times$ gで1時間遠心した。この遠心によって得られた上清をジギトニン抽出画分とした。

2. 12 モノクローナル抗体MCC-1の調製

MCC-1を産生するマウス由来のハイブリドーマ(Hayakawa, et al., 1990)は常法にしたがってある程度まで増殖させ、増殖を速めるために、引き続いてマウス腹腔内で増殖させた。腹腔内投与後のマウスは毎日体重を測定し、腹部が肥大した頃(2~3週間後)を見計らって、腹水を採取した。採取した腹水は、3,000 rpm (KUBOTA KS-4000)で10分間遠心処理した後、上清を一晩4℃で放置した。翌日、100,000 $\times$ gで1時間の遠心から得られた上清をフィルター(0.45 μ m)に通し、これを0.2 M NaClを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で平衡化した抗マウス IgG Sepharose 4B (8 mg IgG/ml $\times$ 5 ml)カラムクロマトグラフィーにかけた。カラムに結合したIgG画分は、3.5 M NaSCNで溶出した。溶出画分のモニタは280 nmの吸光度により行った。溶出画分は直ちに50容の、0.2 M NaClを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で透析($\times$ 5)を行った。調製したMCC-1は、ファルマシア社製のHiTrapアフィニティーカラムに固定化し、免疫親和性カラムクロマトグラフィーを作製した。

2. 1 3 免疫親和性カラムクロマトグラフィーを用いたCa²⁺チャネルの精製

ジギトニン抽出画分を緩衝液Aで10倍に希釈し、ジギトニン濃度を0.1%(W/V)に調整した後、0.1%(W/V) ジギトニンを含む緩衝液A (緩衝液B)で平衡化したモノクローン抗体固定化カラムクロマトグラフィーHiTrap MCC-1(3.5 mg IgG/ml x 1 ml)にかけた。10倍カラム容の緩衝液Bで非特異的な吸着物を洗い流した後、特異的結合画分は0.1%(W/V) ジギトニンを含む0.1 M glycine/HCl緩衝液(pH 3)で溶出した。溶出液は溶出後直ちに中和し、セントリコン-30を用いて濃縮した。濃縮したMCC-1結合画分は、SDS-PAGE解析及びイムノブロット解析に用いた。

2. 1 4 イムノブロテイング

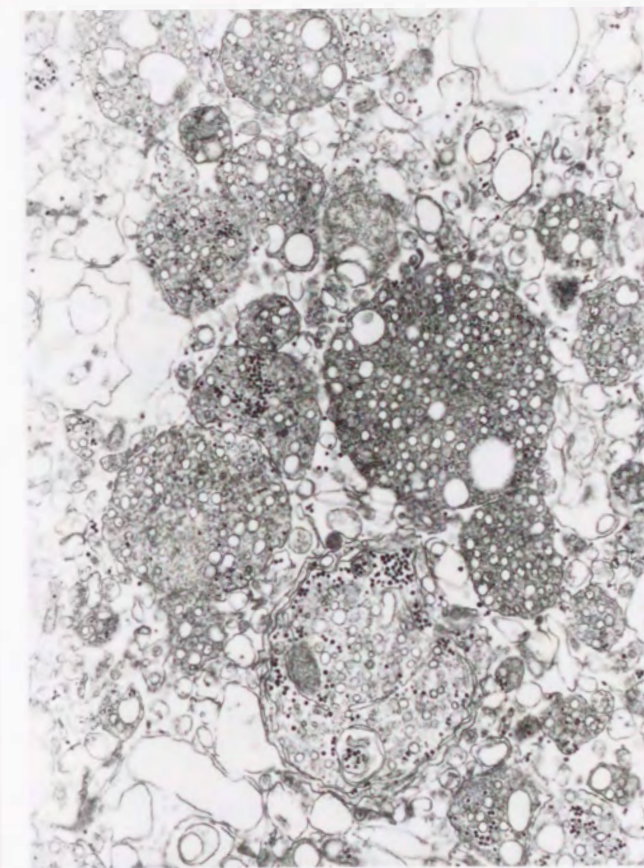
SDS-PAGE終了後、泳動されたタンパク質を0.1 M Tris, 0.192 M glycine, 20% メタノール, 0.005% SDS溶液中、定電流(2 mA/cm²)で2時間、室温において PVDF膜(Immobilon-P, ミリポア社)に転写した。転写終了後のPVDF膜は、5%(W/V) スキムミルクを含むTBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 中で1時間室温で振盪した(ブロッッキング)。TBS-Tで5分間ずつ5回洗った後、一次抗体溶液(MCC-1産生ハイブリドーマの培養上清あるいは精製MCC-1 20 µg/20 ml TBS) 中、4℃で一晩インキュベートした。TBS-Tで5分間ずつ、5回洗った後、抗マウスIgGビオチン化二次抗体(アマシャム社)を加えたTBS溶液中で、1時間室温で振盪した。反応終了後、TBS-Tで5分間ずつ、5回洗った後、ストレプトアビジン・アルカリホスファターゼにつけて20分間振盪した。TBS-Tで5分間、5回洗い、NBTとBCIPを含むTris緩衝液(pH 9.5)中でアルカリホスファターゼの活性染色を行った。

3. 1 電気器官シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜の調製

シナプトソーム画分の収率は、5匹のシビレエイ(電気器官の湿重量約200 g)あたり約20 mg proteinであり、調製に要する時間は5-6時間であった。図. 3-1に調製したシナプトソームの電子顕微鏡写真を示した。直径 $\sim 1 \mu\text{m}$ の膜小胞(シナプトソーム)が観察され、その中にグリコーゲン顆粒及びシナプス小胞と思われる多数の小胞が確認できた。哺乳類脳シナプトソーム中にみられるようなシナプス後膜の付着は観察されなかった。

骨格筋 Ca^{2+} チャネルの α_1 及び β サブユニットは、プロテアーゼの作用を受け易いことが知られており(高橋正身, 1989)、電気器官の Ca^{2+} チャネルにも同様のことが考えられる。従って調製に用いる全ての緩衝液には、実験の部に示したような5種類のプロテアーゼ阻害剤を加えた。しかし、プロテアーゼ阻害剤存在下で調製したシナプトソームを用いてACh定量を行うと化学発光酵素系の阻害がみられたため、ACh遊離の測定に用いるシナプトソーム調製時には、プロテアーゼ阻害剤は加えなかった。

シナプトソーム形質膜は、浸透圧刺激によりシナプトソームを破壊し、シナプトソーム内の可溶性画分を除いたものとした。この操作によって、シナプトソームタンパク質の中約25%をシナプトソーム形質膜タンパク質として回収した。



1 μm

図. 3-1 日本産シビレエイ *Narke japonica* 電気器官より調製したシナプトソームの電子顕微鏡写真。

3. 2 脱分極刺激によって遊離したAChの定量

シナプトソームからのACh遊離は化学発光法によってモニタした。膜電位は、膜の内外における K^+ の濃度差によって決定されるので、外液の K^+ 濃度を上昇させることにより、膜を脱分極させることができる。脱分極刺激に用いる K^+ 濃度は、ネルンストの式を用いて次のようにして決定した。

$$[\text{ネルンストの式}] \quad E_K = RT/F \cdot \ln[K^+]_o / [K^+]_i$$

E_K : ネルンスト電位, R : 気体定数, T : 絶対温度,
 $[K^+]_o$: 細胞外 K^+ 濃度, $[K^+]_i$: 細胞内 K^+ 濃度

18°Cでは、 $E_K = -58 \log[K^+]_o / [K^+]_i$ となる。

シビレイ電気器官神経終末の静止膜電位 -90 mV (大澤一爽, 1986)と $[K^+]_{oUT}=3 \text{ mM}$ を式に代入して終末内の K^+ 濃度を求めると、 $[K^+]_{iN}$ はおよそ 100 mM となる。哺乳類において電気生理学的に確認されている電位感受性 Ca^{2+} チャネルは、膜電位が0になれば全て活性化される(序論の部、表.1-1参照)ので、膜電位が0の時の $[K^+]_{oUT}$ を求めると 100 mM となる。このようにして求めた K^+ 濃度 100 mM を脱分極刺激に用いた。

図. 3-2は、 $3.4 \text{ mM } Ca^{2+}$ 存在下において高濃度(100 mM)のKClによる脱分極刺激によって遊離したAChと、引き続いて 50 pmol のAChを加えた時の化学発光の経時変化を示している。 $37.4 \text{ } \mu\text{g protein}$ のシナプトソームからのAChの遊離量は、曲線下の面積の比較から、 48.2 pmol であった($1.29 \text{ nmol/mg protein}$)。

3 mM から 100 mM への K^+ 濃度の変化による脱分極刺激によって遊離するAChの典型的な量は、 $1.12 \pm 0.36 \text{ nmol/mg protein}$ ($n=9$)であった。この値は、 1% Triton X-100を用いてシナプトソームを破壊して求めた、シナプトソームに含まれる全ACh量 $7.45 \pm 1.76 \text{ nmol/mg protein}$ ($n=15$)の 15% であった。遊離測定の均一性を図るために、シナプトソームは全ACh量が $7.45 \pm 1.76 \text{ nmol/mg protein}$ から外れるものは使用しなかった。

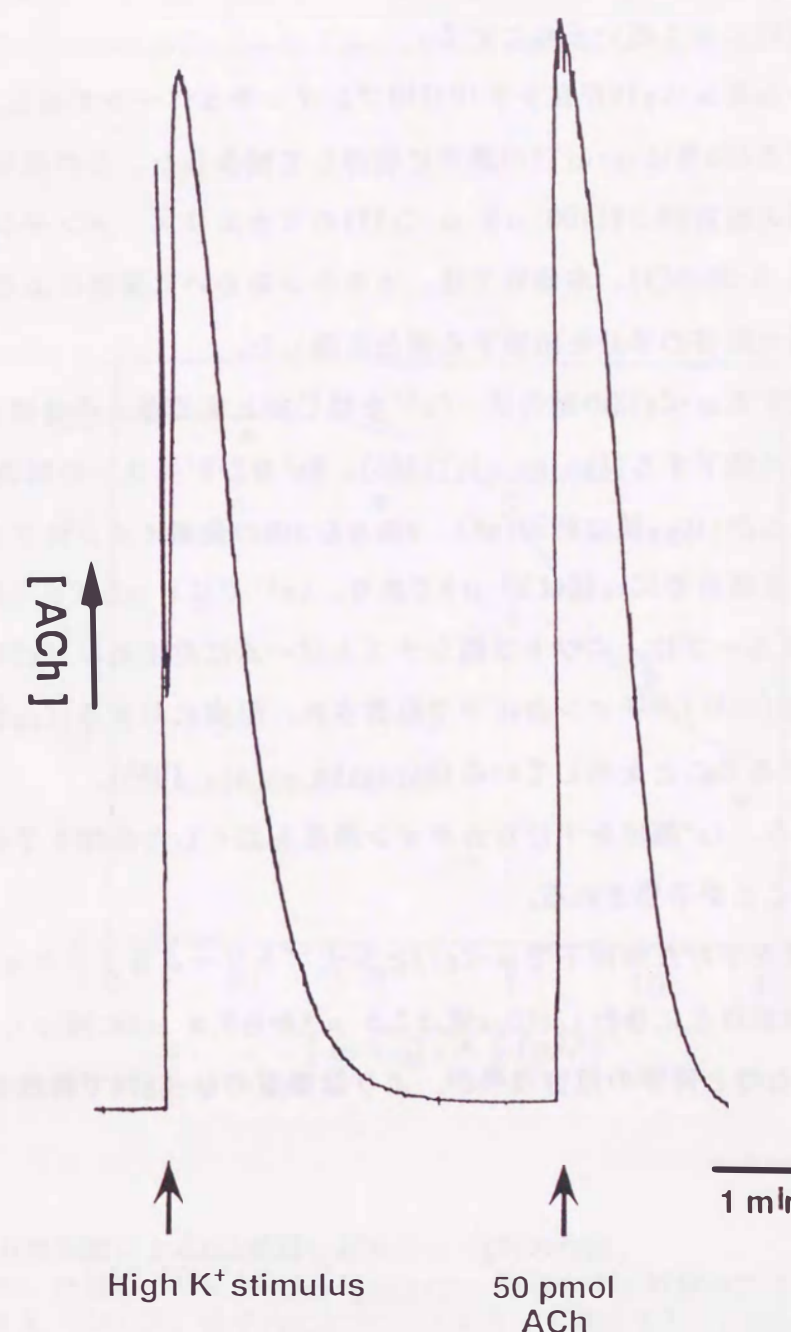


図. 3-2 高 K^+ 脱分極刺激によるシナプトソームからのACh遊離の経時変化。
 遊離したAChは化学発光法により連続的にモニタした。高 K^+ 刺激を行うと(最初の矢印)、
 遊離したACh量に応じた発光ピークが得られる。引き続いて 50 pmol のAChを加えて発光させ
 (2番目の矢印)、記録曲線下面積を比較することによって、遊離されたAChを定量した。

3. 3 ACh遊離に対する ω -CgTXの効果

イモ貝 *Conus geographus* より単離されたポリペプチド毒である ω -conotoxin GVIA (ω -CgTX) (図・3-3A) は、N型 Ca^{2+} チャネルを特異的に阻害し、N型 Ca^{2+} チャネルの薬理学的特徴付けに広く用いられている。

シナプトソームを ω -CgTX 存在下で10分間ブレインキュベートすると、脱分極刺激によって遊離するACh量は ω -CgTXの濃度に依存して減少した。この用量-作用曲線は、 $K_m=2.5 \mu M$ 、最大阻害66.3%(100 μM ω -CgTX)のミカエリス・メンテン式で表すことができた(図・3-3Bの○)。本研究では、トキシンあるいは薬物によるACh遊離阻害の IC_{50} 値を、最大阻害の半分を阻害する値と定義した。

哺乳類脳に対する ω -CgTXの結合は、 Ca^{2+} をはじめとする多くの金属イオン存在下では効果が著しく低下する(Abe et al, 1986)。 Na^{+} 及び K^{+} イオンの阻害作用は比較的弱いものであるが(IC_{50} 値は約50 mM)、2価及び3価の金属イオンはさらに強く阻害する。 Ca^{2+} による阻害の IC_{50} 値は30 μM であり、 La^{3+} では1 μM 以下である。また、Lazdunskiらのグループは、ニワトリ脳シナプトソームに対する ω -CgTXの結合は、1価(Na^{+})及び2価(Ca^{2+})カチオン存在下で阻害され、阻害に対する IC_{50} 値は、各々16 mM及び4 mMであることを示している(Barhanin et al, 1988)。

以上の事実から、 Na^+ 濃度を下げたカチオン濃度を低くした条件下では、 ω -CGTXの効果が上がることが予想される。

溶液のNa⁺濃度を下げた条件下でω-CgTXとシナプトソームをインキュベートすると、用量-作用曲線は左に移行し(IC₅₀値は2.5 μMから0.8 μMに減少)、生理的条件下で観察されたものと同等の阻害効果が、より低濃度のω-CgTXで観察された(図.3-3Bの●)。

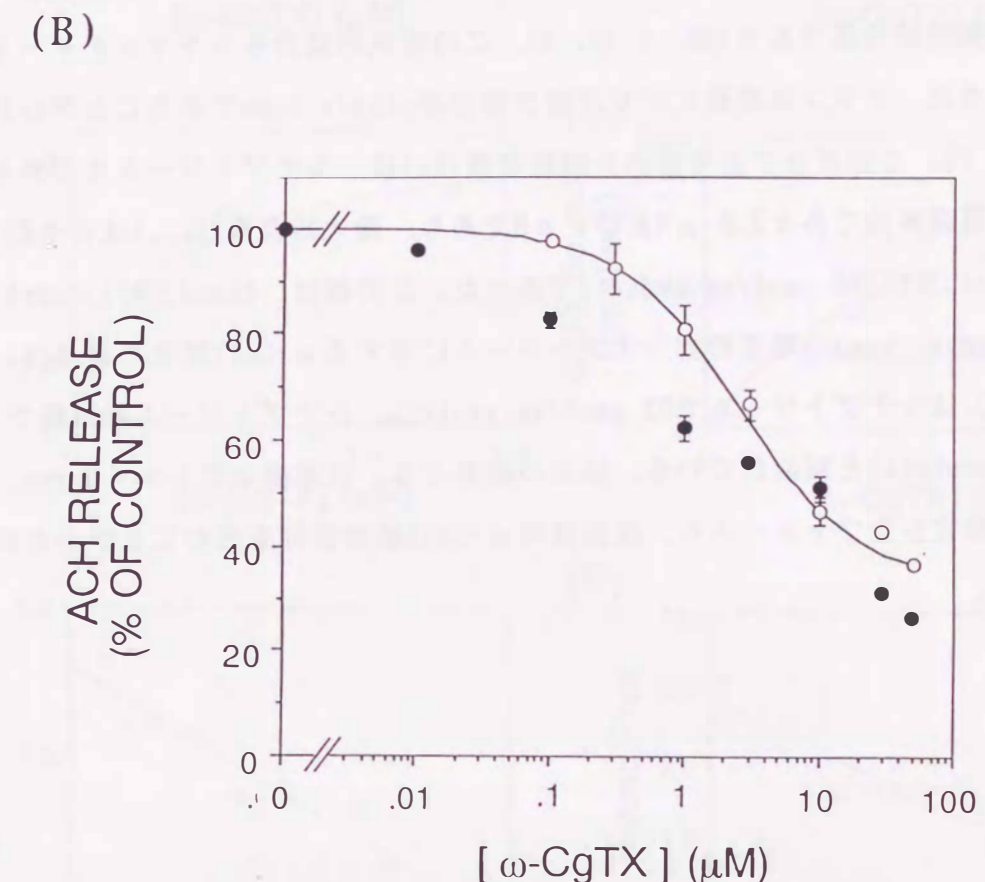
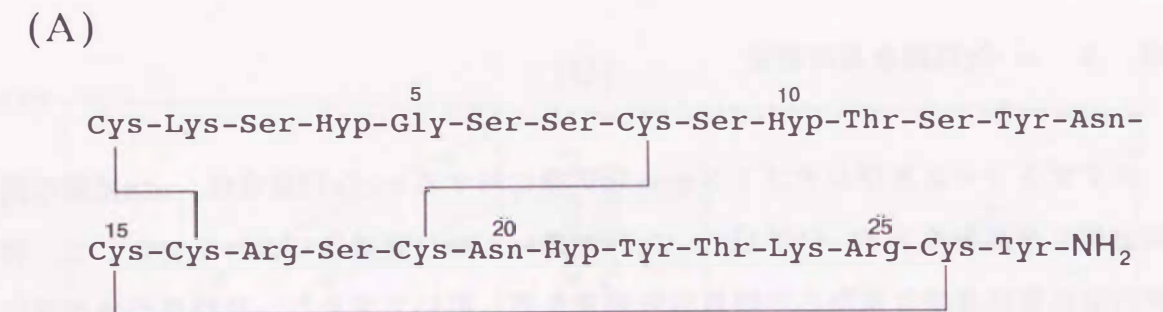


図. 3-3 脱分極刺激によるACh遊離に対する ω -CgTXの作用。

(A) ω -CgTXの一次構造。イモ貝 *Conus geographus* の産生する27個のアミノ酸からなるポリペプチド毒(M.W. 3037.3)。分子内に3つのジスルフィド結合をもつ。Oliveraらによって精製され、アミノ酸配列が決定された(Olivera et al, 1984)。(B) ω -CgTXによるACh遊離の阻害。 ω -CgTX非存在下において遊離したACh量を100%とした。(○) 生理的条件下(280 mM NaCl, 400 mM sucrose, 3 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 3.4 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 50 mM urea, 40 mM HEPES/Tris, pH 7.4)及び、(●)低イオン強度条件下(56 mM NaCl, 670 mM sucrose, 3 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 3.4 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, 50 mM urea, 40 mM HEPES/Tris, pH 7.4)における効果を調べた。Na⁺濃度を下げることによって生じる浸透圧変化は、sucroseで調節した。

3. 4 ω -CgTX結合量の測定

シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜に対する ω -CgTX結合は、ACh遊離の測定と同じ溶液条件下で、 $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega\text{-CgTX}$ を用い、吸引濾過法によって測定した。特異的結合量は全結合量から非特異的吸着量を差し引いて求めた。非特異的吸着量は、多量(100 μM)の非放射性 $\omega\text{-CgTX}$ 存在下における $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega\text{-CgTX}$ の結合量とした。図. 3-4AとDの全結合量(上部トレース)から非特異的吸着量(下部トレース)を差し引いたものが特異的結合量であり(図. 3-4B, E)、この特異的結合をスキッチャード・プロットすると、グラフは直線にのり、結合部位がsingle typeであることがわかる(図. 3-4C, F)。このグラフより求めた解離定数(K_D)は、シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜画分で各々2.8 μM 及び7 μM であり、最大結合量($B_{\max}$)は各々45 pmol/mg protein及び200 pmol/mg proteinであった。この値は、AhmadとMiljanichが行った*Discopyge ommata*電気器官シナプトソームに対する $\omega\text{-CgTX}$ 結合の結果($K_D=3\text{-}5\text{ }\mu\text{M}$, $B_{\max}$ はシナプトソームで52 pmol/mg protein, シナプトソーム形質膜で290 pmol/mg protein)と類似している。以上の結果より、日本産シビレエイ*Narke japonica*電気器官シナプトソームも、高密度の $\omega\text{-CgTX}$ 結合部位を含むことが示された。

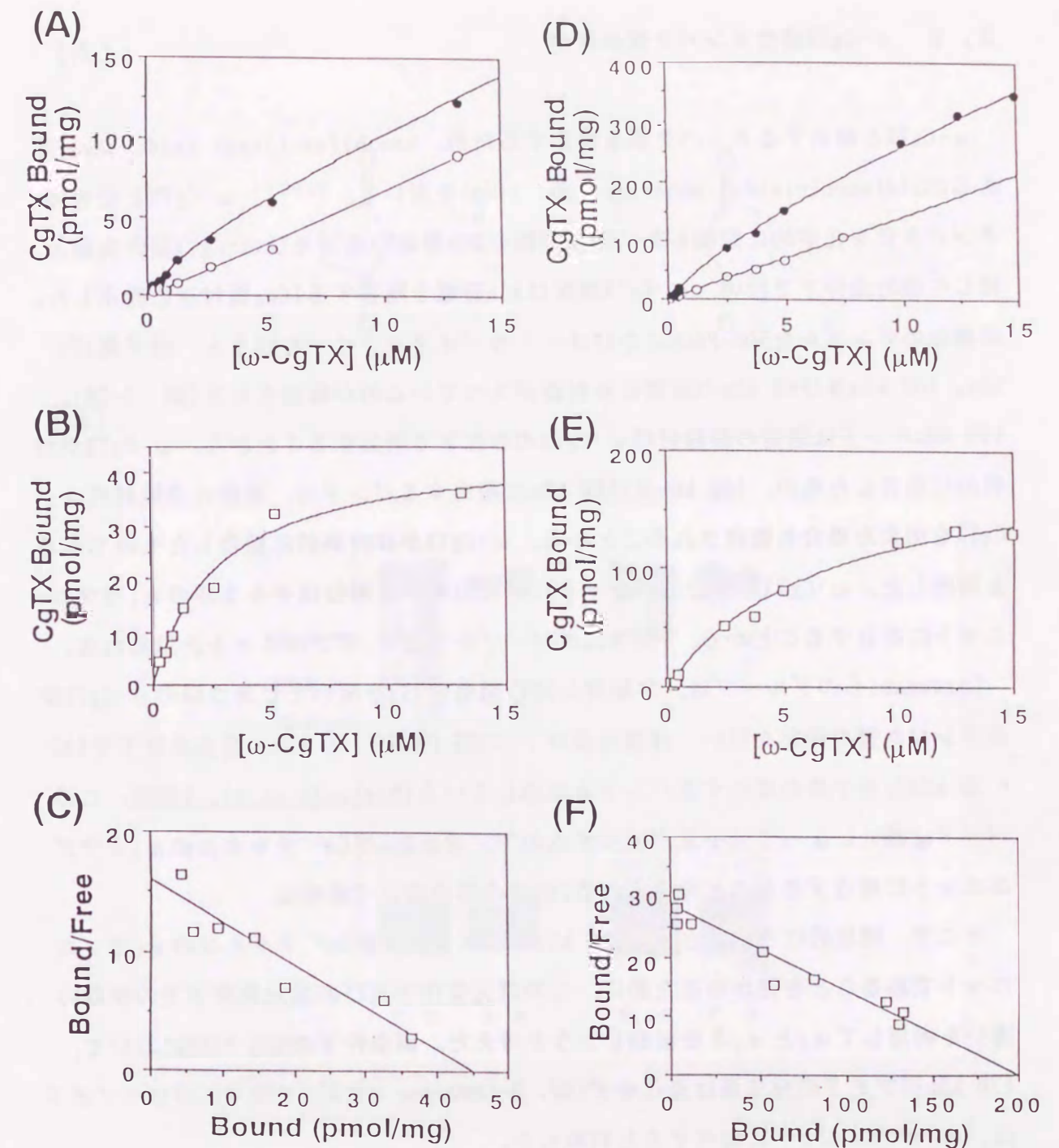


図. 3-4 シビレエイ電気器官シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜に対する $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega\text{-CgTX}$ の結合。
(A)~(C)はシナプトソーム、(D)~(F)はシナプトソーム形質膜に対する $\omega\text{-CgTX}$ の結合。
(A), (D)の●は全結合量、○は非特異的吸着量を示す。(B), (E)は各々(A), (D)の全結合量から非特異的吸着量を差し引いて求めた特異的結合量を示す。(C), (F)はスキッチャード・プロットを示す。このグラフより、シナプトソームでは、 $K_D=2.8\text{ }\mu\text{M}$, $B_{\max}=45\text{ pmol/mg protein}$ 、シナプトソーム形質膜では、 $K_D=7\text{ }\mu\text{M}$, $B_{\max}=200\text{ pmol/mg protein}$ という値が得られた。

3. 5 ω -CgTX結合タンパク質の同定

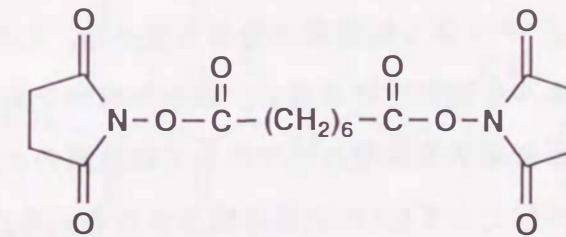
ω -CgTXと結合するタンパク質を同定するため、homobifunctional imido esterであるDSS(disuccinimidyl suberate, 図. 3-5A)を用いて、 $[^{125}\text{I}]$ - ω -CgTXと受容体タンパク質を化学的に架橋した。架橋実験はACh遊離の測定及び ω -CgTX結合実験と同じ生理的条件下で行い、 ω -CgTX濃度はACh遊離を阻害する IC_{50} 値付近に設定した。架橋後のサンプルをSDS-PAGEにかけオートラジオグラフィーを行うと、分子量170 kDa, 100 kDa及び60 kDaの位置に放射能が入っているのが確認された(図. 3-5B)。170 kDaバンドは過剰の非放射性 ω -CgTXの存在下で消失することから、 ω -CgTXが特異的に結合したものの、100 kDa及び60 kDaに相当するバンドは、過剰の非放射性 ω -CgTXを加えた場合も観察されることから、 ω -CgTXが非特異的に結合したものであると判断した。 ω -CgTXを含む Ca^{2+} チャネル阻害剤の作用部位はチャネルの α_1 サブユニットに存在することから、170 kDaポリペプチドは α_1 サブユニットと思われる。

Lazdunskiらのグループは、本研究と同じ架橋剤DSSを用いてヒヨコ脳の ω -CgTX結合タンパク質の同定を行い、非還元条件下のSDS-PAGEで170 kDa、還元条件下で140 + 30 kDaと分子量の変化するバンドを確認している(Barhanin et al, 1988)。このバンドは還元によって分子量が減少するので、骨格筋L型 Ca^{2+} チャネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットに相当するものと考えられる(序論の部の図.1-2参照)。

そこで、特異的にラベルされた170 kDaポリペプチドが Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニットであることを確かめるために、この還元条件下及び非還元条件下での挙動の違いを利用して α_1 と $\alpha_2\delta$ を区別しようと考えた。両条件下のSDS-PAGEにおいて、170 kDaペプチドの分子量は変化せず(図. 3-5Bのlane 1と3)、170 kDaポリペプチドは、 α_1 サブユニットに相当すると判断した。

Horneらはシビレエイ*Discopyge ommata*電気器官シナプトソームに対する ω -CgTXの架橋を最初に報告し、170 kDa, 60 kDa, 42 kDaのバンドを確認している(Horne et al, 1991)。このうち、最も架橋される割合の高い42 kDaバンドは、ニコチン性AChレセプター(nAChR)の α_1 サブユニットであることを報告している。しかし、著者の行った架橋実験では、nAChRに相当するバンドは確認されなかった。

(A)



(B)

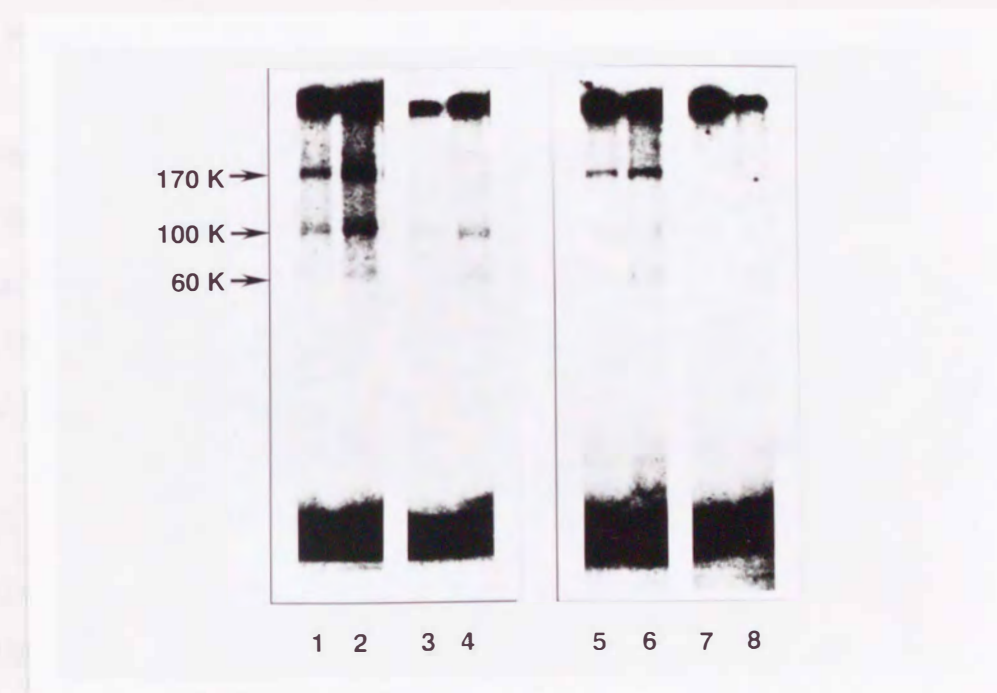


図. 3-5 $[^{125}\text{I}]$ - ω -CgTXを化学架橋したシナプトソーム形質膜のSDS-PAGEゲルのオートラジオグラフィー。

(A) DSS (M.W. 368.35)の化学構造。(B) 架橋反応終了後のシナプトソーム形質膜を、非還元条件下(lane 1~4)及び還元条件下(lane 5~8)のSDS-PAGEにかけ、ゲル乾燥した後、 ^{125}I のオートラジオグラフィーを行った。lane 1, 2, 5, 6は、100 μM ω -CgTX非存在下、lane 3, 4, 7, 8は、100 μM ω -CgTX存在下で架橋を行った。また、DSS濃度は0.03 mM, 0.3 mM(lane奇数番号)、3 mM(lane偶数番号)で行ったが、0.03 mMではラベルされるものは何も観察されなかった。

3. 6 ACh遊離に対するL型Ca²⁺チャネルブロッカーの効果

シビレイ電気器官神経終末からのACh遊離に対するL型Ca²⁺チャネルの関与を明らかにするために、L型Ca²⁺チャネル阻害剤の効果を調べた。1,4-ジヒドロピリジン(DHP)類は、L型Ca²⁺チャネルを特徴付ける最も一般的な薬物である。DHP類は脂溶性が高く、高濃度用いると膜に局所麻酔的に作用して細胞膜のイオン透過性を抑制する。このため、脱分極が起こらずAChの遊離が阻害される。そこで、著者はDHP類の中でも比較的水溶性の高いニカルジピン(図. 3-6A)を実験に用いた。ニカルジピンは、0.5~1 μMでACh遊離を阻害し始め、その阻害は濃度依存的であった。用量-作用曲線は、K_m=9 μM、最大阻害85%のミカエリス・メンテンの式で表すことができた(図. 3-6Bの○)。以上の結果、シビレイ電気器官神経終末にはL型Ca²⁺チャネルが存在し、ACh遊離に関与していることが示唆された。

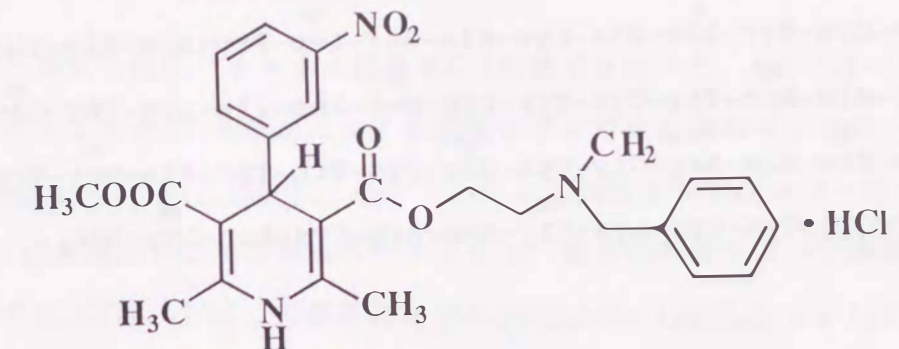
3. 3で示したように、シビレイ電気器官神経終末にはω-CgTX感受性のチャネルが存在する。ニカルジピンの作用するチャネルがω-CgTX感受性チャネルであるかどうかを確かめるために、両阻害剤を同時に加える実験を行った。3 μM ω-CgTX存在下におけるニカルジピンの用量-作用曲線は下方にずれ、両Ca²⁺チャネルブロッカーの作用は相加的であり(図. 3-6Bの●)、両阻害剤が各々独立した部位に作用していることが示された。

また、L型Ca²⁺チャネルを特異的にブロックする天然物毒素であるカルシセプチンの効果も調べた。カルシセプチン(図. 3-7A)は、蛇毒Black manba, *Dendroaspis polylepis polylepis*由来のポリペプチド毒であり、T及びN型Ca²⁺チャネルには作用せず、L型Ca²⁺チャネルをnMレベルで特異的に阻害する。最も強力なDHP類の1つであるPN-200-110と同等の阻害効果を示す(Weille et al, 1991)。この毒素は極めて水溶性が高いため、高濃度用いても膜に対する非特異的な作用もなく、L型Ca²⁺チャネルの存在の確認に適していると思われる。

カルシセプチンは濃度依存的にACh遊離を阻害した(図. 3-7B)が、高濃度用いても部分的な阻害しか示さなかった(20 μMで28%阻害)。

ACh遊離を阻害するニカルジピン濃度が比較的高濃度であること、そしてカルシセプチンの阻害が部分的であることは、ACh遊離に関与するL型Ca²⁺チャネルの寄与が小さいことを示唆している。

(A)



(B)

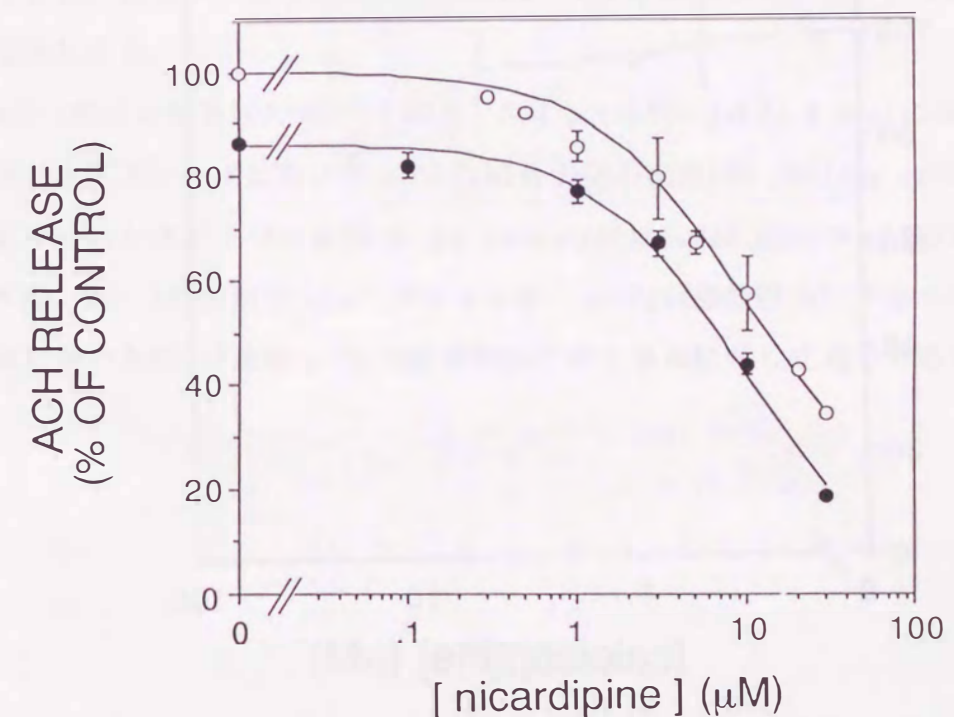
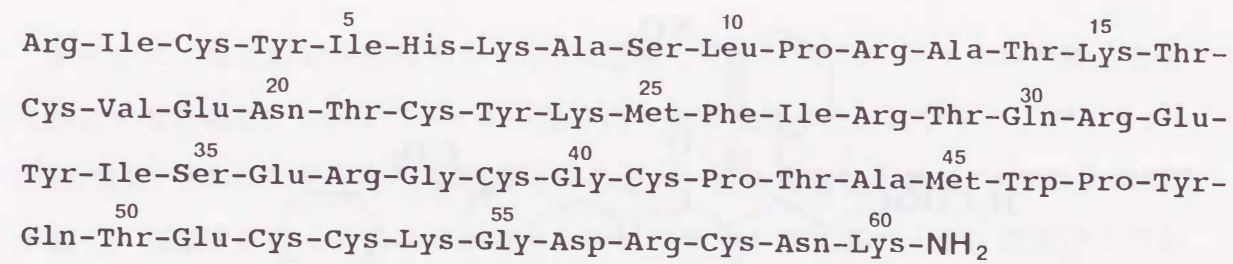


図. 3-6 脱分極刺激によるACh遊離に対するニカルジピンの作用。

(A) 塩酸ニカルジピン (M.W. 515.99)の構造。(B) ニカルジピンによるACh遊離の阻害。○はニカルジピンの用量-作用曲線を、●は3 μM ω-CgTX存在下におけるニカルジピンの用量-作用曲線を示す。

(A)



(B)

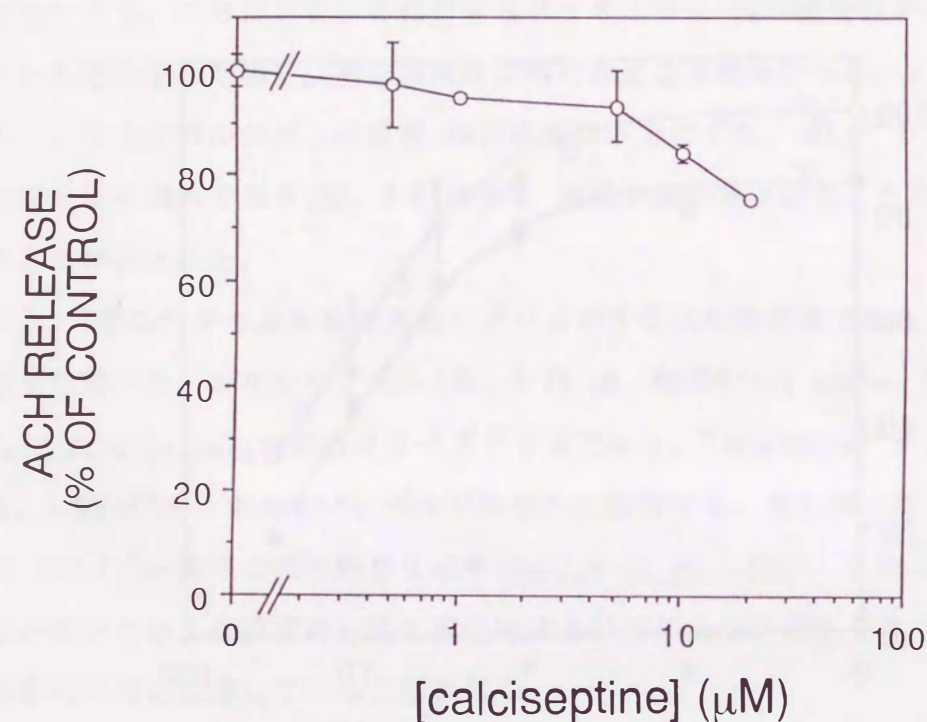


図. 3-7 脱分極刺激によるACh遊離に対するカルシセプチンの作用。

(A) カルシセプチンの一次構造。蛇毒Black manba, *Dendroaspis polylepis polylepis*由来の60個のアミノ酸からなるポリペプチド毒(M.W. 7036.1)。分子内に4個のジスルフィド結合をもつ。(B) カルシセプチンによるACh遊離の阻害。

3. 7 ACh遊離に対する抗Ca²⁺チャネル抗体の効果

ACh遊離に対する抗Ca²⁺チャネル抗体MCC-1の効果を調べた。MCC-1はウサギ骨格筋L型Ca²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットを認識するマウス由来のモノクローナル抗体である(Hayakawa et al, 1990)。MCC-1(3.4 μg IgG)をシナプトソーム(20.4 μg protein)と10分間25℃でインキュベートすると、脱分極刺激によって遊離するAChが25.1%抑制された(図. 3-8)。対照的にマウスnonimmune IgG(6.5 μg IgG)は、ACh遊離には影響を与えなかった。以上のことは、MCC-1がACh遊離に関与するCa²⁺チャネルに特異的に作用したことを示している。MCC-1の認識するCa²⁺チャネルは、骨格筋L型Ca²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ 様サブユニットを持つことが予想される。

最近、ウサギ脳より ω -CgTX感受性N型Ca²⁺チャネルが精製され、そのサブユニットの一部(α_2 及び β)は、骨格筋L型Ca²⁺チャネルと相同性が高いことが示唆されている(Witcher et al, 1993)。MCC-1は、L型Ca²⁺チャネル由来のサブユニットを認識すると思われるが、 ω -CgTX感受性N型Ca²⁺チャネルのサブユニットを認識している可能性もある。

MCC-1の分子量を156,000とすると、3.4 μgのMCC-1は21.8 pmolに相当する。電気器官シナプトソームにおける ω -CgTX結合部位の密度(45 pmol/mg protein)から、実験に用いたシナプトソーム20.4 μg proteinには0.918 pmolの ω -CgTX結合部位が存在する。MCC-1の作用するCa²⁺チャネルが、 ω -CgTX感受性Ca²⁺チャネルであれば、実験に用いたMCC-1量は ω -CgTX感受性Ca²⁺チャネルに対して充分であると思われる。

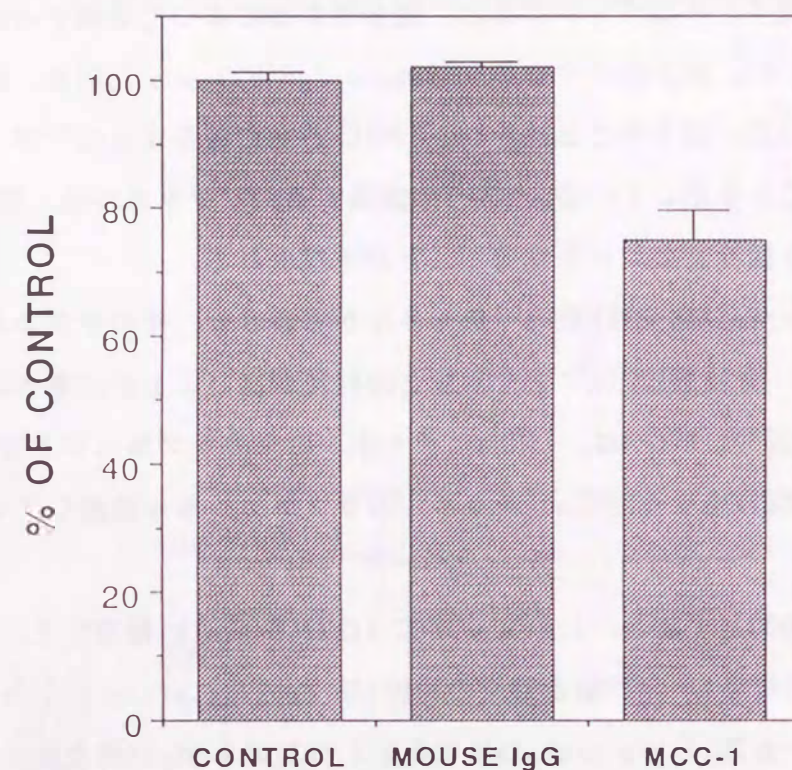


図. 3-8 MCC-1によるACh遊離の阻害。

MCC-1はマウス由来のモノクローナル抗体であり、ウサギ骨格筋DHP感受性L型Ca²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットを認識する。controlは100 ± 1.1% (n=3), mouse IgGでは102.3 ± 1.0% (n=3), MCC-1では、74.9 ± 4.7% (n=3)

3. 8 シナプス前膜タンパク質の可溶化及び免疫親和性カラムクロマトグラフィーを用いたCa²⁺チャネルの精製

骨格筋L型Ca²⁺チャネルの場合、DHP結合能を維持したまま可溶化する界面活性剤としてはジギトニンとCHAPSが知られており(Curtis and Catterall, 1984; Borsotto et al, 1985)、これらの界面活性剤を使用すると、サブユニット構造を維持したまま可溶化することができる。本研究では、ジギトニンを用いることにした。ジギトニン：タンパク質の比を4：1になるようにした場合のタンパク質の可溶化率は、40.5 ± 4.23% (n=3)であった。

MCC-1固定化カラムクロマトグラフィーからの特異的結合画分の溶出は、酸性(pH 3)条件下で行った。溶出画分のSDS-PAGEゲルを銀染色解析すると、いくつかのポリペプチドバンドが観察された(図. 3-9)。この中の非還元条件下において観察される170 kDaポリペプチド(lane 1のa)は、還元条件下では分子量が減少し、骨格筋L型Ca²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットと類似した挙動を示した。さらに、MCC-1によるイムノブロット解析を行うと、この170 kDaポリペプチドとMCC-1が免疫反応することが明らかとなり、170 kDaポリペプチドはCa²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ 様サブユニットであることが判明した(図. 3-10のlane 3)。

また、SDS-PAGEゲル上の35 kDaのバンドは、抗シンタキシン抗血清と免疫反応した(図. 3-10のlane 1)。シンタキシンは、哺乳類脳において ω -CgTX感受性Ca²⁺チャネルと会合しており、シナプス小胞と形質膜の融合に関与するタンパク質と考えられている(Saisu et al, 1991; Inoue et al, 1992; Inoue and Akagawa, 1992; Bennett et al, 1992; Yoshida et al, 1992)。対照実験として、nonimmuneマウスIgGを固定化したカラムクロマトグラフィーを作製し、同様の実験を行ったが、カラムに結合した成分中には抗シンタキシン抗血清と反応するものは見いだされなかった(図. 3-10のlane 2)。このことから、シンタキシンは直接あるいは間接的に170 kDaポリペプチドと会合しており、MCC-1と免疫反応する170 kDaポリペプチドを介して抗体カラムに結合していることが判明した。

シンタキシンの存在は、MCC-1の認識するCa²⁺チャネルが伝達物質の遊離に関与することを支持している。

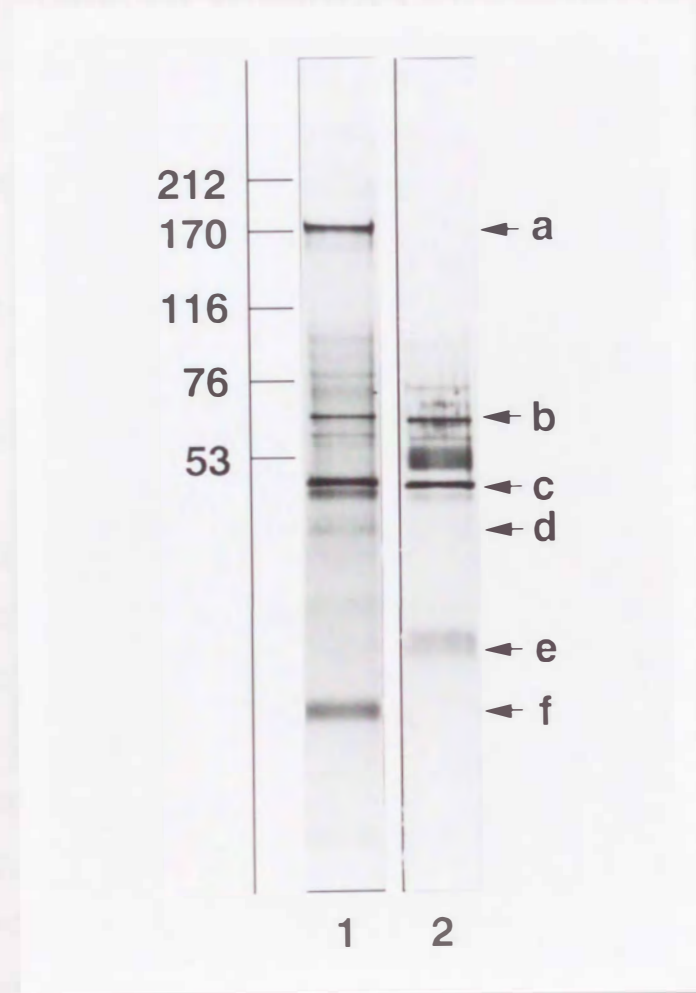


図. 3-9 HiTrap MCC-1カラムクロマトグラフィーから酸性条件下(pH 3)で溶出した画分のSDS-PAGEゲルの銀染色パターン。
SDS-PAGEは、5-20%ポリアクリルアミド連続密度勾配ゲルを用い、非還元条件下(lane 1)及び還元条件下(lane 2)で行った。左の数字は分子量マーカーの位置を示す。上からミオシン(212 kDa), α_2 -マクログロブリン(170 kDa), β -ガラクトシダーゼ(116 kDa), トランスフェリン(76 kDa), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(53 kDa)。

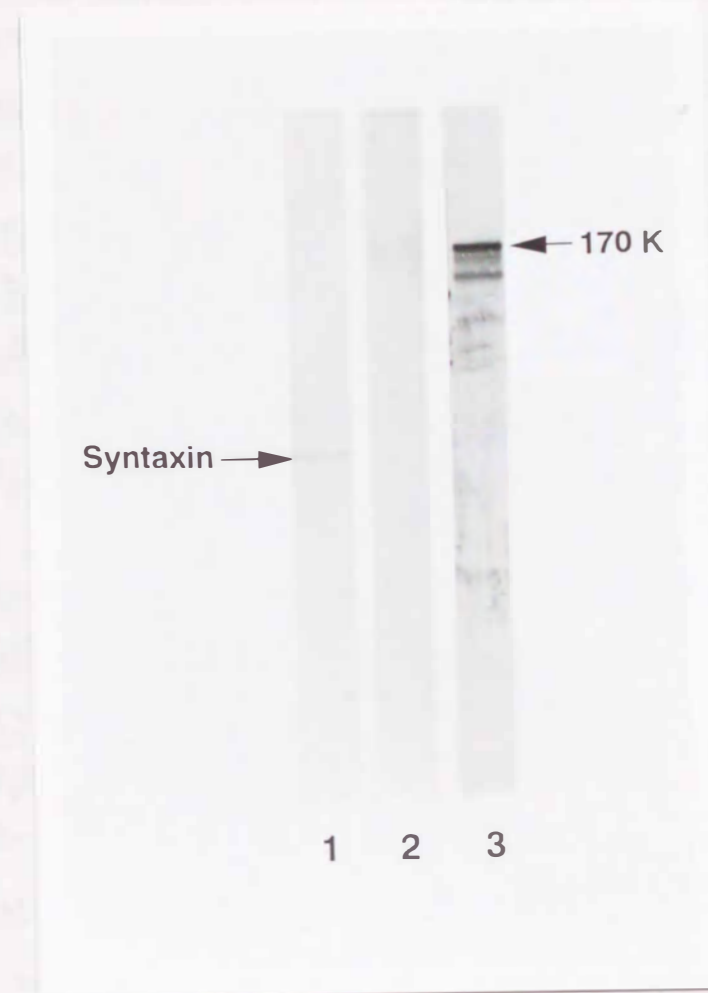


図. 3-10 MCC-1カラム及びマウスnonimmune IgG Sepharose結合画分のイムノブロット解析。
stainingには、MCC-1あるいは抗シンタキシン抗体を含むウサギ血清を用いた。Lane 1は、MCC-1固定化カラムクロマトグラフィーによって精製した画分の抗シンタキシン抗血清による免疫染色。Lane 2は、マウス nonimmune IgG Sepharose結合画分の抗シンタキシン抗血清による免疫染色。Lane 3は、MCC-1固定カラムクロマトグラフィーによって精製した画分のMCC-1による免疫染色。

4.1 伝達物質遊離に対する ω -CgTXの効果

電位感受性 Ca^{2+} チャネルの分布とその性質を明らかにするには薬理的なアプローチが極めて有効な手段である。3.3で示したように、*Narke japonica*より調製したシナプトソームからのACh遊離は ω -CgTXによって μM レベルで阻害された。 ω -CgTXによるACh遊離の阻害の IC_{50} 値は $2.5 \mu\text{M}$ であった。また、 $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega$ -CgTXを用いて受容体の密度を調べると、高密度のsingle typeの特異的結合部位の存在が示された(シナプトソームで $45 \text{ pmol/mg protein}$ 及びシナプトソーム形質膜で $200 \text{ pmol/mg protein}$)。シナプトソームに対する ω -CgTXの結合親和性($K_D=2.8 \mu\text{M}$)は、ACh遊離阻害の IC_{50} 値($2.5 \mu\text{M}$)と非常に近い値を示し、このことは ω -CgTX感受性 Ca^{2+} チャネルがACh遊離の制御を主として行っていることを示している。

シビレエイ電気器官シナプトソームからの伝達物質遊離に対する ω -CgTXの作用は2つの研究グループからも報告されている(表4-1参照)。Ahmadらは、伝達物質であるAChと共に遊離されるATPに注目し、*Discopyge ommata*より単離したシナプトソームからのATP遊離及びシナプトソームへの ^{45}Ca 流入に対する ω -CgTXの阻害効果を調べた。ATP遊離及び ^{45}Ca 流入に対する ω -CgTXの阻害の IC_{50} 値は、各々 $\sim 3 \mu\text{M}$ と $\sim 2 \mu\text{M}$ であった。ATP遊離阻害の IC_{50} 値は、本研究で得たACh遊離阻害の IC_{50} 値と類似している。

一方、Farinasらは、*Torpedo marmorata*から単離したシナプトソームからのATP遊離は ω -CgTXによって顕著に阻害される($\text{IC}_{50}=2 \mu\text{M}$)が、ACh遊離はあまり影響を受けず($50 \mu\text{M}$ ω -CgTXで30%の減少)、ATP遊離及びACh遊離に対する ω -CgTXの作用が異なると報告している。シビレエイ電気器官シナプス小胞内には、AChとATPが同時に含まれており、エキソサイトシスの際には両方がいっしょに遊離されと考えられている。ACh遊離とATP遊離は同じ現象であるという考えからは彼らの結果は理解し難い。

4.2 ω -CgTX結合量

$[^{125}\text{I}]\text{-}\omega$ -CgTXを用いてシビレエイ電気器官シナプトソーム及びシナプトソーム形質膜に対する ω -CgTXの結合を調べた。その結果、シナプトソームで $K_D=2.8 \mu\text{M}$, $B_{\text{max}}=45 \text{ pmol/mg protein}$ 、シナプトソーム形質膜で $K_D=7 \mu\text{M}$, $B_{\text{max}}=200 \text{ pmol/mg protein}$ という値が得られた。この値は、Ahmadらが*Discopyge ommata*電気器官シナプトソームから得た結果($K_D=3\text{--}5 \mu\text{M}$, 最大結合量はシナプトソームで $52 \text{ pmol/mg protein}$ 、シナプトソーム形質膜で $290 \text{ pmol/mg protein}$)と非常に近いものであった。Horneらも*Discopyge ommata*より単離したシナプトソーム膜に対する ω -CgTX結合を測定している($K_D=0.6 \mu\text{M}$, $B_{\text{max}}=280 \text{ pmol/mg protein}$)。この結果は著者とAhmadらの結果と比較すると K_D 値に違いがみられる。この違いは測定の際に用いた溶液の金属カチオン濃度の違いによると思われる。著者とAhmadらの測定は生理的条件下(伝達物質遊離を測定した時と同じ溶液条件; 高濃度の1価カチオンと 3.4 mM Ca^{2+} 存在下)で行っているのに対し、Horneらは 20 mM Tris/HCl , 1% BSAという金属カチオンを全く含まない溶液条件で行っている。前述のように、哺乳類脳に対する ω -CgTX結合は金属カチオンによって拮抗的に強く阻害されることが知られており(Abe et al, 1986; Cruz and Olivera, 1986; Wagner et al, 1988)、おそらくシビレエイ電気器官シナプトソームの ω -CgTX受容体も哺乳類のものと類似した性質をもつと考えられる。

哺乳類脳シナプトソーム膜には、 K_D 値が $\sim 1 \text{ pM}$ から 1 nM の高親和性の ω -CgTX結合が $B_{\text{max}}=\sim 1 \text{ pmol/mg protein}$ 存在する(Abe et al, 1986; Cruz and Olivera, 1986; Abe and Saisu, 1987; Barhanin et al, 1988; Feigenbaum et al, 1988; Yamaguchi et al, 1988)。これに対し、電気器官シナプトソーム形質膜に対する ω -CgTX結合の K_D 値は μM レベルと低親和性である。この違いはアッセイに用いた溶液のイオン強度の違いも関与していると思われる。脳シナプトソーム膜でのほとんどのアッセイは金属カチオンを含まない溶液中で行われたものである。しかしながら、Horneらが測定した電気器官シナプトソームにおける ω -CgTXの結合親和性($K_D=0.6 \mu\text{M}$)は、同じ条件下において測定した脳シナプトソームに比べて親和性は低く、 ω -CgTX結合部位は種や組織の違いによって性質が異なると思われる。

表. 4-1 ω -CgTXによる Ca^{2+} 流入と伝達物質遊離の阻害及び ω -CgTXの膜への結合。
Ahmadらと著者は、阻害の IC_{50} 値を最大阻害の半分を阻害する濃度と定義し、Farinasらは、 ω -CgTX非存在下で測定した Ca^{2+} 流入と伝達物質の遊離量の半分を阻害する濃度と定義している。

	Ahmad et al.	Farinas et al.	our work	Horne et al.
IC_{50}	<i>Discopyge ommata</i>	<i>Torpedo marmorata</i>	<i>Narke japonica</i>	<i>Discopyge ommata</i>
Inhibition of Ca^{2+} influx	3 μM	-	8 μM^*	-
Inhibition of ATP release	2 μM	2 μM	-	-
Inhibition of ACh release	-	167 μM	2.5 μM	-
ω -CgTX binding for synaptosome				
K_D	3 μM	-	2.8 μM	-
B_{max}	52 pmol/mg	-	45 pmol/mg	-
ω -CgTX binding for synaptosomal plasma membranes				
K_D	5 μM	-	7 μM	0.6 μM
B_{max}	290 pmol/mg	-	200 pmol/mg	280 pmol/mg

* O'Hori et al, 1993.

4. 3 ω -CgTX結合タンパク質の同定

ω -CgTXの結合する部位を同定するために、 $[^{125}\text{I}]-\omega$ -CgTXと受容体タンパク質との化学架橋を行った。この実験により、特異的にラベルされた170 kDaのバンドは、還元条件下でもその分子量が変化しないことから、 Ca^{2+} チャネルの α_1 サブユニットに相当するものと思われる。この170 kDaという分子量と ω -CgTXの最大結合量 $B_{\text{max}}=200$ pmol/mg proteinから算出したシナプトソーム形質膜タンパクに占める ω -CgTX結合タンパク質の割合は3.4%となり、シナプトソーム形質膜には高密度の ω -CgTX受容体タンパク質が存在することが明かとなった。

Horneらは、*Discopyge ommata*電気器官シナプトソーム形質膜と $[^{125}\text{I}]-\omega$ -CgTXとの架橋を最初に報告した(Horne et al, 1991)。彼らは、170 kDa, 60 kDa, 42 kDaポリペプチドを ω -CgTX結合タンパク質として同定し、その中で最も架橋される割合の高い42 kDaポリペプチドは、ニコチン性AChレセプター(nAChR)の α_1 サブユニットであると報告している。著者による生理的条件下の架橋実験において、nAChR由来のサブユニットに相当する42 kDaバンドは観察されなかった。

4. 4 伝達物質遊離に対するL型 Ca^{2+} チャネル阻害剤の効果

シビレイ電気器官神経終末からの伝達物質遊離におけるL型 Ca^{2+} チャネルの関与については、L型 Ca^{2+} チャネルを特異的に阻害する1,4-ジヒドロピリジン(DHP)類を用いて薬理的に検討され、いくつかの報告がある(Yeager et al, 1987; Farinas et al, 1993)。YeagerとAhmadは、10 μM のニトレンジピンが*Discopyge ommata*電気器官シナプトソームからのATP遊離には何も影響しないことを示し、また、Farinasらは、ニモジピン、ニフェジピンが各々1及び5 μM の濃度で全く作用しないことを報告している。

本研究では、他の研究グループが用いたDHPよりも、比較的水溶性の高いニカルジピンを用いて、高濃度領域でのDHPの効果を調べた。3. 6に示したようにニカルジピンは、0.5~1 μM で作用し始め、濃度依存的にACh遊離を阻害し($\text{IC}_{50}=9$ μM)、L型 Ca^{2+} チャネルの存在が示唆された。

ACh遊離へのL型Ca²⁺チャネルの関与をより明確にするために、水溶性のポリペプチド毒であるカルシセプチンの効果を調べた。

しかし、L型Ca²⁺チャネルに対してより選択性の高いカルシセプチンによる阻害は、20 μMで約30%と部分的であった。この結果から神経終末にはL型Ca²⁺チャネルも存在するが、ACh遊離に対するL型Ca²⁺チャネルの役割が副次的であることが示唆される。

4. 5 シビレエイ電気器官神経終末のCa²⁺チャネル

シビレエイ電気器官シナプトソームからのACh遊離は、哺乳類P型Ca²⁺チャネルのブロッカーであるイモ貝*Conus magus*から単離されたポリペプチド毒ω-CmTX MVTCによって特異的に阻害される(IC₅₀=1.8 μM, 最大阻害74.8%) (将積鈴代, 1994)。また、Moulianらも、クサグモの1種*Agelenopsis aperta*の毒液及びその毒液から精製した毒素の1つFTXの両方が脱分極刺激によるACh遊離を阻害することを報告し、電気器官におけるP型Ca²⁺チャネルの存在を示唆している(Moulian and Gaudry-Talarmin, 1993)。 *Agelenopsis aperta*の毒液には、アシルポリアミン及びペプチドからなる種類の異なる毒素が含まれていることが示されている(Adams et al, 1990; Quistad et al, 1990; Skinner et al, 1989)。これらの毒素の中で、ω-アガトキシンはいくつかの標品においてnMレベルでCa²⁺電流を阻害し、ω-Aga-IVAの標的タンパク質がP型Ca²⁺チャネルであることが最近示されている(Mintz et al, 1992)。

このように、シビレエイ電気器官神経終末には本研究において明らかにしたN型(ω-CgTX感受性)及びL型(DHP感受性)の2種以外にも、P型Ca²⁺チャネルの存在が示唆されており、数種のCa²⁺チャネルが終末部に共存していると考えられる。この結果は、active zoneには複数種のCa²⁺チャネルが存在するという事実と一致している(Takahashi and Momiya, 1993; Turner et al, 1993)。神経終末のactive zoneにおいて、いくつかの種類の異なるCa²⁺チャネルが同時に存在することは、シナプス機能にとって重要であると思われる。各シナプスの特徴は、電気生理学的に異なった性質をもつCa²⁺チャネルの可変的な性質を反映しているのかもしれない。不活性化キネティクスの異なる数種類のCa²⁺チャネルが同一のシナプスに存在することに

より、シナプスにおける伝達物質遊離の微妙な調節が可能になると想像される。

4. 6 ACh遊離に対する抗Ca²⁺チャネル抗体の効果

分子生物学的解析において、L型Ca²⁺チャネルα₁サブユニットの電気生理学的性質は、他のサブユニットを同時に発現させることによって変化することが示されている。心筋及び骨格筋L型Ca²⁺チャネルα₁サブユニットの場合、α₂, β, γそしてδサブユニットを同時に発現させると、発現するチャネルの数の上昇、キネティクス、活性化及び不活性化の電位依存性などのパラメーターが修飾される(Lacerda et al, 1991; Varadi et al, 1991; Wei et al, 1991; Singer et al, 1991)。また、哺乳類脳からクローン化されたα₂及びβサブユニットのcDNAは、骨格筋のものとのアミノ酸配列の相同性が非常に高く(Kim et al, 1992; Williams et al, 1992)、哺乳類脳のクラスA、クラスB及びクラスDのα₁サブユニットを発現させた場合に観察されるCa²⁺電流は、脳のα₂とβサブユニットを同時に発現させることによって増強される(Mori et al, 1991; Williams et al, 1992)。

最近、Ellinorらは、*Discopyge ommata*よりクローニングしたCa²⁺チャネル遺伝子(doe-1)をアフリカツメガエルの卵母細胞において発現させるには、骨格筋L型Ca²⁺チャネルのα₂とβサブユニットのmRNAを同時に発現させないと、チャネル電流が観察されないことを報告している(Zhang et al, 1993)。

以上の事実から、シビレエイ電気器官のCa²⁺チャネルにも、骨格筋L型Ca²⁺チャネルのα₂及びβサブユニットに類似したサブユニットが存在すること、そしてこれらのサブユニットはチャネルの機能発現に重要であることが予想される。

ウサギ骨格筋L型Ca²⁺チャネルのα₂δサブユニットを認識するモノクローナル抗体MCC-1を作用させると、興味あることにシナプトソームからのAChの遊離が25%程度抑制された。この抑制は伝達物質遊離に関与するCa²⁺チャネルのα₂δサブユニットにMCC-1がシナプトソームの外側から結合すると、α₁サブユニットに何等かの影響が出た結果、Ca²⁺流入が阻害されたためと考えられる。

4. 7 免疫親和性カラムクロマトグラフィーを用いたCa²⁺チャネルの精製

MCC-1の認識するタンパク質を明らかにするために、MCC-1を固定化した免疫親和性カラムクロマトグラフィーを作製し、シナプトソーム形質膜のジギトニン抽出画分からMCC-1結合タンパクの精製を行った。精製画分のSDS-PAGEを行った結果、この画分には、MCC-1が認識する170 kDaポリペプチド及びその他いくつかのタンパク質が含まれていた。この170 kDaポリペプチドは、還元下のSDS-PAGEにおいて、見かけの分子量が減少する $\alpha_2\delta$ サブユニット様の挙動を示し、架橋実験から同定した ω -CgTX結合部位を有する α_1 様サブユニット(170 kDa)とは異なるものである。MCC-1はL型Ca²⁺チャネルの $\alpha_2\delta$ サブユニットを認識する抗体であることから、MCC-1が認識したサブユニットはL型Ca²⁺チャネルのサブユニットである可能性が高い。しかし、哺乳類脳のN型Ca²⁺チャネルのサブユニットの一部(α_2 と β)は、骨格筋L型Ca²⁺チャネルのものと相同性が高いことが報告されており(Witcher et al, 1993)、MCC-1が認識する $\alpha_2\delta$ 様サブユニットは、 ω -CgTX感受性N型Ca²⁺チャネルのサブユニットである可能性もある。表. 4-2は、精製された哺乳類Ca²⁺チャネルの各サブユニットの分子量を比較したものである。このうち、 α_2 及び β サブユニットは、N型、L型の区別なくアミノ酸配列の相同性が高く、また分子量も類似している。精製画分のSDS-PAGEゲルパターン(図. 3-13)中にみられるバンドb及びバンドeは、分子量の類似性から各々 β サブユニット及び δ サブユニットと予想される。

本研究では、MCC-1カラムにより精製されるCa²⁺チャネルの、中心的なサブユニットとなる α_1 サブユニットを同定することができなかった。精製画分中には、還元及び非還元条件下のSDS-PAGEで分子量の変化しない分子量170~230 kDaのバンドは観察されなかった。 α_1 サブユニットはプロテアーゼの作用を受け易いことが知られており(高橋正身, 1989)、精製中に分解された可能性もある。

表. 4-2 精製した哺乳類 ω -CgTX感受性N型Ca²⁺チャネル及びDHP感受性L型Ca²⁺チャネルのサブユニット構造の比較。 $\alpha_2(\alpha_2\delta)$ サブユニット及び β サブユニットは、N型、L型を問わず分子量が類似している(McEnery et al, 1991)。

Molecular mass, kDa				
	ω -CgTX receptor		DHP receptor	
	rat brain	rabbit brain	rabbit brain	skeletal
subunit				
α_1	230	230	175	155-200
α_2	140	140	142	122-145
	110	95	100	
β_2	70			
β_3	60	57	57	50-65
γ	?	?	?	30-35
δ	?	+	+	20-30

4. 8 シンタキシン

イムノブロット解析の結果、MCC-1カラムによって精製される画分中には、膜融合に関与すると考えられているシンタキシン(35 kDa)が含まれていた。シンタキシンはシナプトソーム形質膜に存在し、膜融合の際、シナプス小胞タンパクであるシナプトタグミン(65 kDa)と相互作用することによってシナプス小胞に対する受容体タンパク質として機能すると考えられている(O'Connor et al, 1993; Horikawa et al, 1993)。また、抗シンタキシン抗体が可溶化したラット脳シナプトソームと $[^{125}\text{I}]\text{-}\omega\text{-CgTX}$ 結合物を免疫沈降することから、シンタキシンはシナプトソーム形質膜においてN型 Ca^{2+} チャンネルと会合していることが示唆されている(Saisu et al, 1991; Inoue and Akagawa, 1992; Inoue et al, 1992; Yoshida et al, 1992; Bennett et al, 1992)。

3. 7において、MCC-1がシナプトソームからのACh遊離を抑制したことに加えて、MCC-1カラム結合成分中にシンタキシンが存在したことは、MCC-1が認識する Ca^{2+} チャンネルがシナプス伝達に関与していることを強く示唆している。

また、哺乳類脳において、シンタキシンは $\omega\text{-CgTX}$ 受容体(N型 Ca^{2+} チャンネル)と複合体を形成しており、DHP受容体(L型 Ca^{2+} チャンネル)とは直接関与していない。このことは、MCC-1が認識する Ca^{2+} チャンネル複合体がN型に分類されることを示唆している。

総括

本研究により以下のことが明かとなった。

1. 日本産シビレエイ *Narke japonica* 電気器官シナプトソームには、高密度の $\omega\text{-CgTX}$ 結合部位(N型 Ca^{2+} チャンネル)が存在し、伝達物質遊離に関して主要な役割を果たしている。
2. このチャンネルに存在する $\omega\text{-CgTX}$ 結合部位は、哺乳類の $\omega\text{-CgTX}$ 結合部位と同様な性質(カチオンに対する影響)をもつ半面、哺乳類脳のN型チャンネルに比べて、低親和性である。
3. $\omega\text{-CgTX}$ 受容体タンパク質の分子量は、170 kDaであり、シナプトソーム形質膜タンパク質の3.4%と高密度を占める。
4. 電気器官シナプトソームには、DHP感受性のL型 Ca^{2+} チャンネルも存在するが、伝達物質遊離に関しては副次的な役割を果たしている。
6. 伝達物質の遊離に関与する Ca^{2+} チャンネルには、骨格筋L型 Ca^{2+} チャンネルと類似したサブユニット構造をもつものが存在する。
7. この Ca^{2+} チャンネルは、シナプス小胞の融合に関与すると思われるシンタキシンと複合体を形成している。

引用文献

- 1) 阿部輝雄 (1990) 代謝 27, 3: 35-45. Caチャネルと細胞機能
- 2) Abe, T., Koyano, K., Saisu, H., Nishiuchi, Y. and Sakakibara, S. (1986) Neurosci. Lett. 71: 203-208. Binding of ω -conotoxin to receptor sites associated with the voltage-sensitive calcium channel
- 3) Abe, T. and Saisu, H. (1987) J. biol. Chem. 262: 9877-9882. Identification of the receptor for ω -conotoxin in brain. Probable components of the calcium channel
- 4) Adams, M.E., Bindokas, V.P., Hasegawa, L. and Venema, V.J. (1990) J. biol. Chem. 265: 861-867. ω -Agatoxin: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom
- 5) Ahljanian, M.K., Westenbroek, R.E. and Catterall, W.A. (1990) Neuron 4: 819-832. Subunit Structure and Localization of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels in Mammalian Brain, Spinal Cord, and Retina
- 6) Ahmad, S.N. and Miljanich, G.P. (1988) Brain Res. 453: 247-256. The calcium channel antagonist, ω -conotoxin, and electric organ nerve terminals: binding and inhibition of transmitter release and calcium influx
- 7) Barhanin, J., Schmid, A. and Lazdunski, M. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 150: 1051-1062. Properties of structure and interaction of the receptor ω -conotoxin, a polypeptide active on Ca^{2+} channels
- 8) Bean, B.P. (1989) Annu Rev. Physiol. 51: 367-384. Classes of calcium channels in vertebrate cells
- 9) Bennett, M.K., Calakos, N., Scheller, R.H. (1992) Science 257: 255-259. Syntaxin: a Synaptic Protein Implicated in Docking of Synaptic Vesicles at Presynaptic Active Zones
- 10) Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1985) J. biol. Chem. 260: 14255-14263. The 1,4-Dihydropyridine Receptor Associated with the Skeletal Muscle Voltage-dependent Ca^{2+} Channel
- 11) Catterall, W.A. and Striessnig, J. (1992) Trends Pharmac. Sci. 13: 256-262. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists
- 12) Cazalis, M., Dayanithi, G. and Nordmann, J.J. (1987) J. Physiol. 390: 55-70. Hormone release from isolated nerve endings of the rat neurohypophysis
- 13) Curtis, B.M. and Catterall, W.A. (1984) Biochem. 23: 2113-2118. Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules
- 14) Cruz, L.J. and Olivera, B.M. (1986) J. biol. Chem. 261: 6230-6233. Calcium Channel Antagonists
- 15) Dooley, D.J., Lupp, A., Hertting, G. and Osswald, H. (1988) Eur. J. Pharmacol. 148: 261-267. ω -Conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release
- 16) Ellinor, P.T., Zhang, J-F., Randall, A.D., Zhou, M., Schwarz, T.L., Tsien, R.W. and Horne, W.A. (1993) Nature 363: 455-458. Functional Expression of a Rapidly Inactivating Neuronal Calcium Channel
- 17) Farinas, I., Solson, C. and Marsal, J. (1992) Neurosci. 47: 641-648. Omega-conotoxin differentially blocks acetylcholine and adenosine triphosphate from *Torpedo* synaptosomes
- 18) Feigenbaum, P., Garcia, M.L. and Kaczorowski, G.J. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 154: 298-305. Evidence for distinct sites coupled to high affinity ω -conotoxin receptors in rat brain synaptic plasma membrane vesicles

- 19) Hayakawa, N., Morita, T., Yamaguchi, T., Mitsui, H., Mori, K.J., Saisu, H., and Abe, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173: 483-490. The high affinity receptor for ω -conotoxin receptors calcium channels different from those sensitive to dihydropyridines in mammalian brain
- 20) Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J. and Tsien, R.W. (1988) Science 239: 57-61. Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons
- 21) Horikawa, H.P.M., Saisu, H., Ishizuka, T., Sekine, Y., Tsugita, A., Odani, S., and Abe, T. (1993) FEBS Lett. 330: 236-240. A complex of rab3A, SNAP-25, VAMP/synaptobrevin-2 and syntaxins in brain presynaptic terminals
- 22) Horne, W.A., Ellinor, P.T., Inman, I., Zhou, M., Tsien, R.W. and Schwarz, T.L. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 3787-3791. Molecular diversity of Ca^{2+} channel α_1 subunits from the marine ray Discopyge ommata
- 23) Horne, W.A., Hawrot, E. and Tsien, R.W. (1991) J. biol. Chem. 266: 13719-13725. ω -conotoxin GVIA receptors of Discopyge Electric Organ
- 24) Holz, G.G., Dunlap, K. and Kream, R.M. (1988) J. Neurosci. 8: 463-471. Characterization of the Electrically Evoked Release of Substance P from Dorsal Root Ganglion Neurons: Methods and Dihydropyridine Sensitivity
- 25) Inoue, A. and Akagawa, K. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1144-1150. Neuron-specific antigen HPC-1 from bovine brain reveals strong homology to epimorphin, an essential factor involved in epithelial morphogenesis: identification of a novel protein family
- 26) Inoue, A., Obata, K. and Akagawa, K. (1992) J. biol. Chem. 267: 10613-10619. Cloning and Sequence Analysis of cDNA for a Neuronal Cell Membrane Antigen, HPC-1
- 27) Israel, M., and Lesbats, B. (1981) J. Neurochem. 37: 1475-1483. Continuous determination by a chemiluminescent method of acetylcholine release and compartmentation in Torpedo electric organ synaptosomes
- 28) Israel, M., Lesbats, B., Morel, N., Manaranche, R., GulikKrzywicki, T. and Dedieu, J.C. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 277-281. Reconstitution of a functional synaptosomal membrane possessing the protein constituents involved in acetylcholine translocation
- 29) Katz, B. (1969) (Liverpool University press). The Release of Neuronal Transmitter Substances
- 30) Kim, H-L., Kim, H., Lee, P., King, R.G. and Chin, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3251-3255. Rat Brain Expresses an Alternatively Spliced Form of the Dihydropyridine-Sensitive L-Type Calcium Channel α_2 Subunit
- 31) Lacerda, A.E., Kim, H.S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., Birnbaumer, L. and Brown, A.A. (1991) Nature 352: 527-530. Normalization of current kinetics by interaction between the α_1 and β subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel
- 32) Laemmli, U.K. (1970) Nature(Lond.), 227: 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
- 33) Lemos, J.R. and Nowicky, M.C. (1989) Neuron 2: 1419-1426. Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals
- 34) Linas, R. (1982) Sci. Am. 247: 56- Calcium in synaptic transmission
- 35) Linas, R., Sugimori, M., Hillman, D.E. and Cherksey, B. (1992) Trends Neurosci. 15: 351-355. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system

- 36) Madeddu, L., Meldolesi, J., Pozzan, T., Sanclemente, L.E.C. and Bon, C. (1984) *Neurosci.* 12: 939-949. α -Latrotoxin and Glycerotoxin Differ in Target Specificity and in the Mechanism of Their Neurotransmitter Releasing Action
- 37) McEnery, M.W., Snowman, A.M., Sharp, A.H., Adams, M.E. and Snyder, S.H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11095-11099. Purified ω -Conotoxin GVIA Receptor of Rat Brain Resembles a Dihydropyridine-Sensitive L-Type Calcium Channel
- 38) Miller, R.J. (1987) *Science* 235: 46-52. Multiple calcium channels and neuronal function
- 39) Miller, R.J. and Fox, A.P. (1990) Wiley-Liss, New York. 97-138. In Intracellular Calcium Regulation
- 40) Mintz, I.M., Adams, M.E. and Bean, B.P. (1992) *Neuron* 9: 85-95. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons
- 41) Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. and Adams, M.E. (1992) *Nature* 355: 827-829. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA
- 42) Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.-S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T. and Numa, S. (1991) *Nature* 350: 398-402. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel
- 43) Mouliau, N. and Gaudry-Talarmain, Y.M. (1993) *Neurosci.* 54: 1035-1041. AGELENOPSIS APERTA venom and FTX, a purified toxin, inhibit acetylcholine release in Torpedo synaptosomes
- 44) Nowycky, M.C., Fox, A.P. and Tsien, R.W. (1985) *Nature* 316: 440-443. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity

- 45) Niidome, T., Kim, M.-S., Friedrich, T. and Mori, Y. (1992) *FEBS Lett.* 308: 7-13. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain
- 46) O'Connor, V.M., Shamotienko, O., Grishin, E. and Betz, H. (1993) *FEBS Lett.* 326: 255-260. On the structure of the 'synaptosecretosome' Evidence for a neurexin/synaptotagmin/syntaxin/ Ca^{2+} channel complex
- 47) 大澤一爽. (1986) 東京大学出版会「シナプス小胞」その生物物理学
- 48) O'Hori, T., Wang, C.-Y., Tokumaru, H., Chen, L.-C., Hatanaka, K., Hirashima, N., and Kirino, Y. (1993) *Neurosci.* 54: 1043-1050. Action and Binding of Omega-conotoxin on the Putative Calcium Channel of Synaptosomal Plasma Membrane from Electric Organ of Japanese Electric Ray, *Narke japonica*
- 49) Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.T., Luque, F.A. and Gray, W.R. (1984) *Biochemistry* 23: 5087-5090. Purification and Sequence of a Presynaptic Peptide Toxin from *Conus geographus* Venom
- 50) Quistad, G.B., Suwanrumpha, S., Jarema, M.A., Shapiro, M.J., Skinner, W.S., Jamieson, G.C., Lui, A. and Fu, E.W. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 51-56. Structures of paralytic acylpolyamines from the spider. *Agelenopsis aperta*.
- 51) Randall, A.D., Wendland, B., Schweizer, F., Miljanich, G., Adams, M.E. and Tsien, R.W. (1993) *Soc. Neurosci. Abstr.* In press. Five pharmacologically distinct high voltage-activated Ca^{2+} channels in cerebellar granule cells
- 52) Reynolds, I.J., Wagner, J.A., Snyder, S.H., Thayer, S.A., Olivera, B.M. and Miller, R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8804-8807. Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by ω -conotoxin fraction GVIA

- 53) Saisu,H., Ibaraki,K., Yamaguchi,T., Sekine,Y. and Abe,T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 59-66. Monoclonal antibodies immunoprecipitating ω -conotoxin-sensitive calcium channel molecules recognize two novel proteins localized in the nervous system
- 54) Sano,K., Enomoto,K. and Maeno,T. (1987) Eur. J. Pharmacol. 141: 235-241. Effects of synthetic ω -conotoxin, a new type Ca^{2+} antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission
- 55) Schweitzer,E. (1987) J. Neurosci. 7: 2948-2956. Coordinated release of ATP and ACh from cholinergic synaptosomes^a and its inhibition by calmodulin antagonists
- 56) Singer,D., Biel,M., Lotan,I., Flockerzi,V., Hofmann,F. and Dascal,N. (1991) Science 253: 1553-1557. The roles of the subunits in the function of the calcium channel
- 57) Skinner,W.S., Adams,M.E., Quistad,G.B., Kataoka,H., Cesarin,B.J., Enderlin,F.E. and Schooley D.A. (1989) J. biol. Chem. 264: 2150-2155. Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider Agelenopsis aperta.
- 58) Snutch,T.P. and Reiner,P.B. (1992) Curr. Opin. Neurobiol. 2: 247-253. Ca^{2+} channels: diversity of form and function
- 59) Soong,T.W., Stea,A., Hodson,C.D., Dubel,S.J., Vincent,S.R. and Snutch,T.P. (1993) Science 260: 1133-1136. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family.
- 60) Stadler,H. and Tashiro,T. (1979) Eur. J. Biochem. 101: 171-178. Isolation of synaptosomal plasma membranes from cholinergic nerve terminals and a comparison of their proteins with those of synaptic vesicles
- 61) Suszkiw,J.B., Murawsky,M.M. and Shi,M. (1989) J. Neurochem. 52: 1260-1269. Further Characterization of Phasic Calcium Influx in Rat Cerebrocortical Synaptosomes: Inferences Regarding Calcium Channel Type(s) in Nerve Endings
- 62) 将積鈴代 (1994) 修士論文 シビレエイ電気器官シナプトソームからのアセチルコリン遊離に関するカルシウムチャネルの薬理的性質
- 63) Tachibana,M., Okada,T., Arimura,T., Kobayashi,K. and Piccolino,M. (1993) J. Neurosci. 13: 2898-2909. Dihydropyridine-sensitive Calcium Current Mediates Neurotransmitter Release from Bipolar Cells of the Goldfish Retina
- 64) 高橋正身. 1989 実験医学臨時増刊号 112-113. カルシウムチャネルの構造解析
- 65) Takahashi,M., Seagar,M.J., Jones,J.F., Reber,F.X., and Catterall,W.A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5478-5482. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle
- 66) Takahashi,T. and Momiyama,A. (1993) Nature 366: 156-158. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission
- 67) Tsien,R.W. and Tsien,R.Y. (1990) A. Rev. Cell. Biol. 6: 715-760. Calcium channels, stores and oscillations
- 68) Tsien,R.W., Ellinor,P.T. and Horne,W.A. (1991) Trends Pharmac.Sci. 12: 349-354. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels
- 69) Turner,T.L., Adams,M.E. and Dunlap,K. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9518-9522. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release

- 70) Uchitel, O.D., Protti, D.A., Sanchez, V., Cherksey, B.D., Sugimori, M. and Llinas, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3330-3333. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses
- 71) Varadi, G., Lory, P., Schultz, D., Varadi, M. and Schwartz, A. (1991) *Nature* 352: 159-162. Acceleration of Activation by the β Subunit of the Skeletal Muscle Calcium Channel
- 72) Wang, X., Treistman, S.N. and Lemos, J.R. (1992) *J. Physiol.* 445: 181-199. Two types of high-threshold calcium currents inhibited by ω -conotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis
- 73) Wangner, J.A., Snowman, A.M., Biswas, A., Olivera, B.M. and Snyder, S.H. (1988) *J. Neurosci.* 8: 3354-3359. ω -Conotoxin GVIA Binding to a High-Affinity Receptor in Brain: Characterization, Calcium Sensitivity, and Solubilization
- 74) Wei, X., Perez-Reyes, E., Lacerda, A.E., Schuster, G., Brown, A.M. and Birnbaumer, L. (1991) *J. biol. Chem.* 266: 21,943-21,947. Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit by skeletal muscle β and γ subunits
- 75) Weille, J.R.D., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A. and Lazdunski, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2437-2440. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel
- 76) Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. (1992) *Neuron* 8: 71-84. Structure and Functional Expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, and β Subunits of a Novel Human Neuronal Calcium Channel Subtype
- 77) Witcher, D.R., Waad, M.D. and Campbell, K.P. (1993) *Neuropharmacology* 32: 1127-1139. Characterization of the purified N-type Ca^{2+} channel and the cation sensitivity of ω -conotoxin GVIA binding

- 78) Yamaguchi, T., Saisu, H., Mitsui, H. and Abe, T. (1988) *J. biol. Chem.* 263: 9491-9498. Solubilization of the ω -conotoxin receptor associated with voltage-sensitive calcium channels from bovine brain
- 79) Yeager, R.E., Yoshikami, D., Rivier, J., Cruz, L.J. and Miljanich, G.P. (1987) *J. Neurosci.* 7: 2390-2396. Transmitter release from presynaptic terminals of electric organ: Inhibition by the calcium channel antagonist Omega Conus toxin
- 80) Yawo, H. and Momiyama, A. (1993) *J. Physiol.* 460: 153-172. Re-evaluation of Calcium Currents in Pre- and Postsynaptic Neuron of the Chick Ciliary Ganglion
- 81) Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Kuwahara, R., Ito, T., and Takahashi, M. (1992) *J. biol. Chem.* 267: 24925-24928. HPC-1 Is Associated with Synaptotagmin and ω -Conotoxin Receptor
- 82) Zhang, J.-F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L. and Tsien, R.W. (1993) *Neuropharmacology* 32: 1075-1088. Distinctive Pharmacology and Kinetics of Cloned Neuronal Ca^{2+} Channels and Their Possible Counterparts in Mammalian CNS Neurons

謝辞

本研究は、東京大学薬学部・九州大学薬学部、桐野豊教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導と御助言に厚く感謝致します。また、本研究にあたり、終始貴重な御助言と御教示を賜りました九州大学薬学部、金沢洋子助教授に心から感謝致します。

この論文の発表にあたり、御批評、御討論頂きました本学薬学部生理化学教室、姫野勝教授、並びに同学部微生物薬品化学教室、関水和久教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、適切な御助言と御教示を賜りました本学薬学部、平嶋尚英助手および、放射線医学研究所の安西和紀研究主任、そして新潟大学脳研究所、阿部輝雄助教授に心から感謝致します。

さらに、本研究に常に御協力をいただきました修士2年の将積鈴代氏、修士1年の竹原宏明氏、4年生の井手達雄、八尋知朗氏ならびに、当教室の方々に感謝の意を表します。

