

ラット培養脳神経細胞における NMDA 活性化による 細胞内 Ca^{2+} 濃度の 2 相性変化

吉村 利晴*・蛭名 良雄**・新貝 鉦蔵***
原田 有彦***・中島 一樹**

A Biphasic Increase in Cytosolic Ca^{2+} Concentration Induced by NMDA in Cultured Hippocampal Neurons

Toshiharu YOSHIMURA, Yoshio EBINA, Ryuzo SHINGAI,
Kunihiko HARADA and Kazuki NAKAJIMA

Abstract

We have investigated the changes in cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in cultured hippocampal neurons. NMDA produced a biphasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, consisting of an initial increase (INC1) occurred at several seconds after the start of application and a subsequent increase (INC2) after the end of application. The latter INC2 found in the present paper was larger and longer lasting than INC1, and suggested playing an important role in the long-term potentiation (LTP). The time course of INC2 showed two different patterns; (i) a rise began to decrease within 30 sec after the end of application of NMDA, (ii) continued its increase more than 3 min. To analyse the characteristics of these two different increases, we tried to fit normal distribution functions to the histograms of the maximum increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These two increases in INC1 and INC2 were obtained by subtracting the resting values from the peak value in INC1 and INC2, respectively. The histogram for INC1 was fitted by a sum of the normal distribution functions with one large peak value and with two small peaks. On the other hand, INC2 was well represented by a function composed of two normal distribution ones. Pretreatment of neurons with islet-activating protein (IAP) suppressed INC2 completely in about one-third of experimented neurons. In the rest of neurons treated with IAP, one of the two normal distribution functions disappeared. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in INC2 was suppressed by 40% by IAP.

From those findings, it was suspected that one of mechanisms producing INC2 was coupled with IAP-sensitive GTP-binding protein.

1. はじめに

中枢神経終末に、脳内伝達物質のグルタミン酸を与えると長期にわたるシナプス伝達の促進が起こり、この部分にグルタミン酸受容体の存在が示唆される¹⁾。こ

*大学院電気工学科

**電気電子工学科

***山口大・医・薬理学教室

のグルタミン酸受容体には、そのいくつかの作用薬に
 応答することにより分類したサブ受容体が含まれる。
 現在、これらはキスカル酸受容体、N-methyl-D-
 aspartate (NMDA) 受容体、およびカイニン酸受容
 体の3種類に分類されている²⁾³⁾。一方、1973年海馬ス
 ライス片において短時間の高頻度電気刺激を与えると、
 その刺激のあと長期にわたる伝達の増強が確認され
 た⁴⁾⁵⁾。この現象は長期増強(long-term-potential,
 LTP)と呼ばれ、記憶や学習の基礎的な特性を与え
 るのではないかという期待のもとに多くの研究が行わ
 れている¹⁾⁶⁾。このLTPの発生にはNMDAの存在が
 必要であり、Lynch⁷⁾らによるとNMDA受容体を介す
 る細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の上昇が不可欠であるこ
 とが明らかになった。また近年細胞の膜電流を測定す
 ることで百日ぜき毒素(islet activating protein,
 IAP)により高頻度電気刺激で起こるLTPが抑制され
 るという興味ある事実が報告された⁸⁾。IAPは細胞膜
 のGTP結合タンパク質を介する細胞内貯蔵部からの
 Ca²⁺放出を抑制するものである。またすでに、NMD
 A受容体にある濃度以上のNMDAを与えるとGTP
 結合タンパク質を介する[Ca²⁺]_iの長時間にわたる増加
 が起こることが発見されている⁹⁾。

我々のグループでは、カルシウムイオンインジケ
 タのfura-2¹⁰⁾を負荷したラット培養海馬神経細胞にN
 MD A刺激を行った時の[Ca²⁺]_i変化を測定している。
 本論文はこのNMDA刺激による[Ca²⁺]_iの時間変化を
 検討した結果について述べる。またIAPにより抑制
 されるNMDA刺激による[Ca²⁺]_iの上昇が存在するこ
 とを明らかにし、LTPとの関係を推察する。

2. 実験方法

2-1 細胞培養法

海馬神経細胞をラット胎児(19-21日目)より採取し
 酵素(トリプシン)処理で単離した。単離された細胞
 を、シリコンゴム壁(Flexiperm-Disk, Heraeus Bio-
 -technology)をカバーガラス(マツナミ0.13mm厚)
 に密着させた容器に培養液と共にまいた。そして5-14
 日間インキュベータ内(5%CO₂, 37°C)で培養した。
 培養液(Modified Eagle's MEM+5%牛胎児血清)
 は1週間に3回交換した。細胞の大きさは、SOMAの
 部分で長径及び短径がそれぞれ11.5±1.9, 9.0±1.5
 μmであった。

2-2 Fura-2の負荷法

最終濃度4 μMのfura-2/AM¹⁰⁾を5分間超音波分

散させたMg²⁺を含まない細胞外液(145mM NaCl,
 6mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 0.5mM NaH₂PO₄,
 12.5mM glucose, 5mM HEPES (pH 7.25))を培
 養液と交換する。その後60分間インキュベータ内で保
 持すると、fura-2/AMは細胞膜を通り細胞内でfura-2
 となる。測定前に、余剰の細胞外fura-2/AMを除去す
 るため細胞外液を交換し、再びインキュベータ内で10
 分間保持した。

2-3 細胞の蛍光像測定および解析法

細胞の蛍光像測定および解析法についての詳細は前
 報と同じ方法である¹¹⁾。つまり、本研究においても340
 nmと360nmの2波長光による2励起法により画像処
 理装置(ARGUS-100/CA, 浜松ホトニクス(株))をも
 ちいて解析を行っている。また、定量的なCa²⁺濃度分
 布を得るための校正曲線は光源であるXeランプやフィ
 ルタの劣化の影響を防ぐため3ヶ月毎に作成し直した。

2-4 薬物投与の方法

Fig. 1に示すように内径0.3mmφのU字形に曲げた
 パイプの中をNMDAなどの薬物で満たし、先端部の
 穴(直径約40μm)から高低差(約10cm)による加圧に

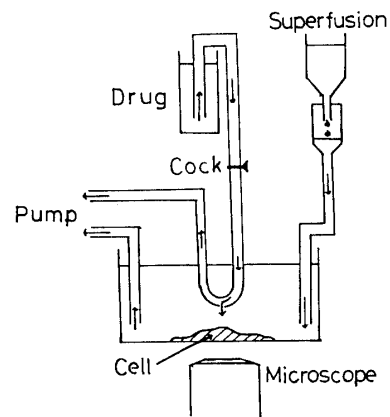


Fig. 1 Drug were applied by a new method. Drug solution, consisted of the same ion component as the superfusion saline were applied to cells through a hole (about 40 μm in diameter) in a U-shaped polyethylene tube (inner diameter 0.3mm). The hole was punctured at the bottom of the tube, and placed about 1.5mm distant from the cell. The change of drug solution was conducted via a stop-cock just before drug application. All superfusion was done at a flow rate of 1 ml/min.

より薬物を細胞に与えた¹²⁾。Drug パイプには途中に開閉するためのコックがついており、それにより薬物投与の開始、終了を調節出来る。また、パイプの穴と細胞の距離は約1-1.5mmであり、薬物の設定濃度をあまり薄めることなく細胞に投与することが出来る。

3. 実験及び解析結果

NMDAによる [Ca²⁺]_iの上昇は、3 μM以上では急峻な立ち上がりを示す第1の上昇(initial increase, INC 1)とNMDA投与終了後約3秒以内に始まる第2の上昇(subsequent increase, INC 2)の2段階からなる。100 μM NMDAを12秒間投与するとFig. 2(a)に示すように明瞭な2相性を呈した。またこのような2相性の変化はNMDA拮抗薬であるAPVの100 μMを細胞外液に加えることによりINC 1, INC 2とも完全に抑制された。他の抑制物質として、細胞外液に1.2mMのMg²⁺を加えた場合にはfig.3のようにINC 1が抑制された。100 μM NMDAでは267個中244個の細胞が2相性を呈した。この2相性変化の特徴を定量的に捉えるために統計的解析を行った。ここで、2相性を呈さない細胞はグリア組織が広がりを持たず疎らになっているなど発育が悪かったので解析には用いなかった。INC 1およびINC 2の変化量を細胞に刺激を与える前の静止状態からそれぞれの状態での[Ca²⁺]_iの最大値までの増加量(以下、Δ[Ca²⁺]_i)で評価し、INC 1, INC 2でのΔ[Ca²⁺]_iの平均値を求めINC 1に対するINC 2を百分率で表わした結果をFig.2(b)に示す。ここに示されるようにINC 2におけるΔ[Ca²⁺]_iは、INC 1におけるΔ[Ca²⁺]_iの150%になりt検定(5%有意性)の結果有意に大きかった。

本論文で用いた図には静止状態での[Ca²⁺]_iが21nMから120nMまでの細胞から得られたもののみを用いた。理由は考察で述べる。

100 μM NMDAを投与した場合の[Ca²⁺]_iの時間変化の様子は、Fig. 4(a) (b)に示すようにINC 2における[Ca²⁺]_iの変化のしかたにより2種に大別することができた。すなわち、Fig. 4(a)に示すように一旦増加したものが、NMDA投与終了後約30秒後に減少を示したものと、Fig. 4(b)に示すように測定を行っている間(約3分間)ではINC 1での増加をそのまま続け減少する様子を呈さなかったものである。このように、同じ刺激により異なった[Ca²⁺]_i変化を示すことより、INC 2を形成するメカニズムには少なくとも2種以上のfactorが関係しているのではないかと考えられる。そこで、2相性変化を示したものの内で、多数回実験を

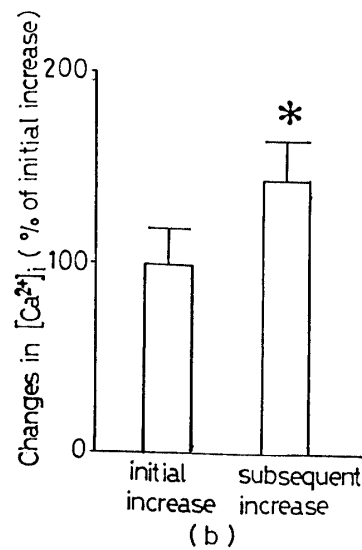
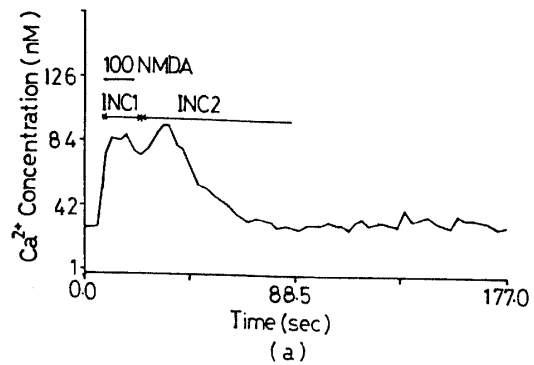


Fig. 2 (a) Response of a biphasic pattern to the application of 100 μM NMDA. Application time was 12 sec as shown by a upper horizontal bar. (b) The subsequent increase (INC2) induced by 100 μM NMDA was compared with the initial increase (INC1). Bar graph indicates mean ± SEM. The asterisk indicated statistically significant difference compared with control (*p < 0.05 t test).

行った100 μM NMDAの例(244件)について、INC 1, INC 2それぞれの場合のΔ[Ca²⁺]_iの頻度分布を調べてみた。すなわち100 μM NMDAを12秒間投与した細胞について、INC 1およびINC 2でのΔ[Ca²⁺]_iを20nM刻みに分け、その時の細胞数を数える。そして横軸にΔ[Ca²⁺]_iをデジタル的にとり、それぞれの区間に対する細胞数を縦軸にして頻度分布図を作った。INC 1, INC 2それぞれの結果をFig. 5(a) (b)に○印で示した。Fig. 5(a)は1個の大きなpeakと

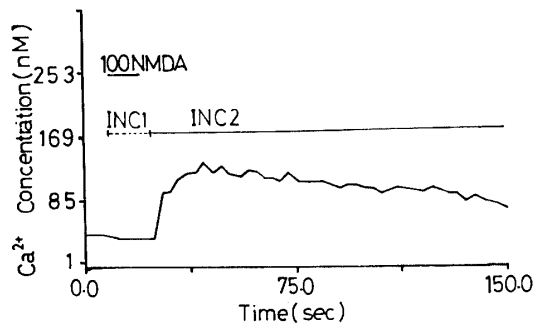


Fig. 3 Response to the application of 100 μ M NMDA in Mg^{2+} condition. Application time was 12 sec as shown by a upper horizontal bar. The initial increase (INC1) was depressed.

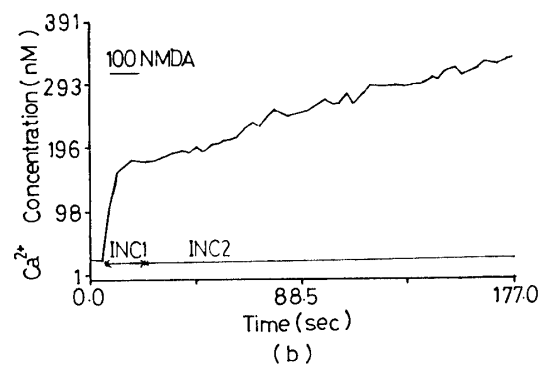
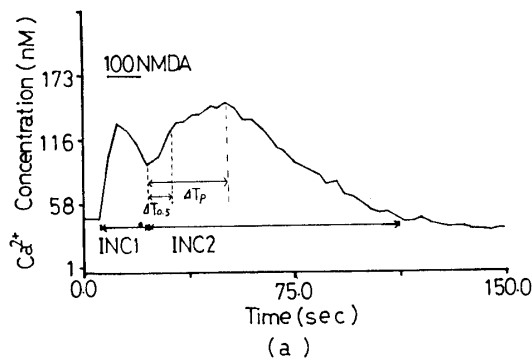


Fig. 4 Response to the application of 100 μ M NMDA. Application time was 12 sec as shown by a upper horizontal bar. The subsequent increase (INC2) showed two different time course patterns; (a) one of which decreases with making a peak within 30 sec after the end of application, and (b) other increases more than 3 min.

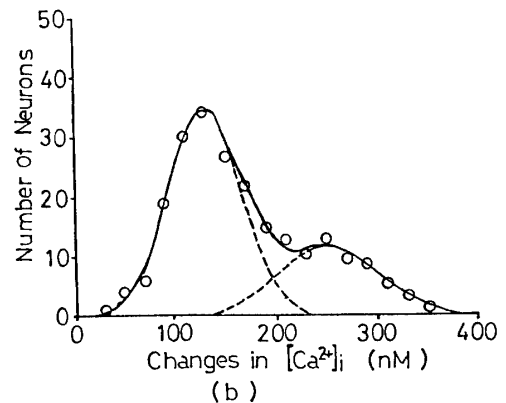
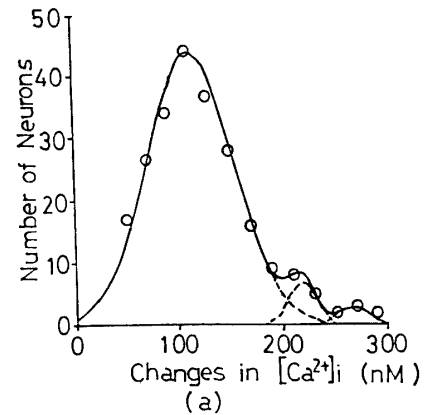


Fig. 5 The histogram of the maximum increase in $[Ca^{2+}]_i$. (a) The initial increase (INC1) was represented by normal distribution functions with a large peak and two small peaks, and (b) the subsequent increase (INC2) was composed of two normal distribution functions.

小さな2個のpeak, またFig.5(b)は明瞭な2個のpeak値を示した.このような頻度分布パターンの違いから, これら (a) (b) 図を出現させている機構がINC1, INC2の両者と違うのではないと思われる.そこで, まず分布を表わす関数形がどのように異なるのかを見ることにした.しかし, 機構のモデルがまだ不明であるのでこれらの結果をどのような既知の分布関数にフィットさせたらよいのか不明である.そこで頻度のpeak値を与える $\Delta[Ca^{2+}]_i$ を平均値とするような正規分布関数の和でフィットさせることを試みた.その結果をFig.5に実線で示した. Fig.5(a)に示すようにINC1の場合の頻度分布図は112nM(SD=41), 220nM(SD=13)および270nM(SD=15)を平均値とする3個の正規分布関数の和で表現出来た. また, INC2の場合はFig.5(b)に示すように131nM(SD=35)

および250nM(SD=50)を平均値とする2個の正規分布関数の和で表現出来た。

一方、すでに序論で述べたようにIAPはGTP結合タンパク質に参与している。そこで、我々が問題としているINC1, INC2に対するGTP結合タンパク質の効果を調べるためにIAP処理(400ng/ml, 37°C, 5%CO₂, 15-18hr)を行った。その結果をFig.6に示す。188個中56個の細胞ではFig.6(a)の点線で示すようにINC2が消失していた。残り132個の細胞では2相性を呈した(Fig.6(b))。2相性を示した時のINC2ではIAP非処理細胞の場合(Fig.4(a))と比較すると[Ca²⁺]_iの上昇の様子が異なる。非処理細胞ではNMDA投与終了後3秒以内に[Ca²⁺]_iの上昇が始まり、peak値の50%になるまでの時間(ΔT_{0.5})がpeak値になるまでの時間(ΔT_p)の3分の1以下になっているのに対し、処理細胞ではΔT_{0.5}がΔT_pの2分の1と遅くなり立ち上がりが緩徐であった。2相性を呈したIAP処理細胞の場合でINC2におけるΔ[Ca²⁺]_iの平均値を求め、非処理細胞の平均値とt検定(5%有意性)により比較した。その結果をFig.6(c)に示す。図からわかるようにIAP処理細胞のほうが非処理細胞の60%と有意に低下していた。更に、INC2におけるΔ[Ca²⁺]_iの頻度分布図を作り、正規分布関数の和をフィットさせた。その結果、Fig.7に実線で示したように2個の正規分布で表わすことが出来た。IAP非処理細胞の場合(Fig.5(b))と比較すると、フィットさせた正規分布関数の平均値が2個とも20%ほど小さくなっている。また、非処理細胞の場合、平均値の大きいほうの正規分布関数のpeak値が小さいほうの約35%なのに対し、処理細胞では約13%と小さくなっている。これらの結果をTable.1にまとめて示した。

4. 考 察

NMDAによる海馬神経細胞の[Ca²⁺]_i変化は3μM以上で2相性を呈す。しかし、superfusionにNMDAを加えて流すbath applicationの方法では、このような2相性の変化を呈することはなかった。よって、2相性になる条件のひとつとして、刺激を短時間に局所的に与えることが必要だと思われる。

本論文の結果には静止状態での[Ca²⁺]_iが20nM以下や121nM以上の細胞から得られたものは用いていない。それは20nM以下の細胞では、薬物投与に対する反応が非常に小さい(Δ[Ca²⁺]_i=24±7nM)ために静止状態での[Ca²⁺]_i変動(5から15nM程度)の影響を受け易く、反応によるものなのか静止状態での揺らぎによる

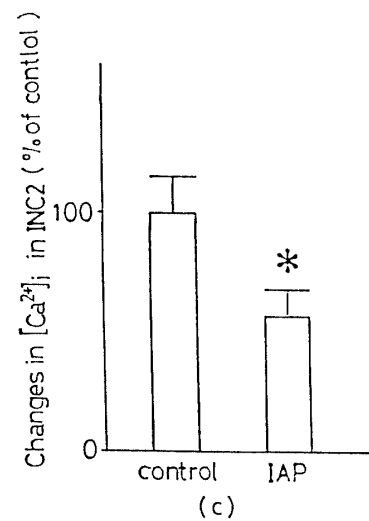
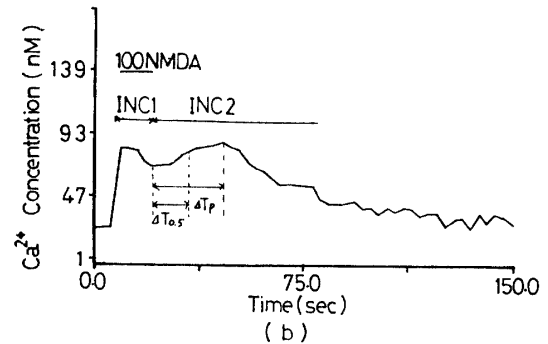
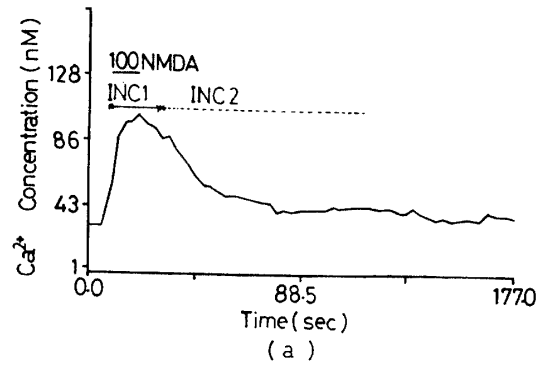


Fig. 6 Effect of IAP on the response to 100 μ M NMDA. Application time was 12 sec as shown by a upper horizontal bar. In 56 neurons out of 188, the subsequent increase (INC2) depressed (a), and the rest of neurons showed a biphasic pattern (b). (c) The subsequent increase induced by 100 μ M NMDA was reduced to 57% by IAP. Bar graph indicates mean±SEM. The asterisk indicates statistically significant difference compared with control (*p<0.05 t test).

Table 1 Parameters of normal distribution functions

	INC1 (control)			INC2 (control)		INC2 (IAP)	
number	44	7	3	34	13	24	4
Mean (nM)	112	220	270	131	250	90	197
SD (nM)	41	13	15	75	50	70	30

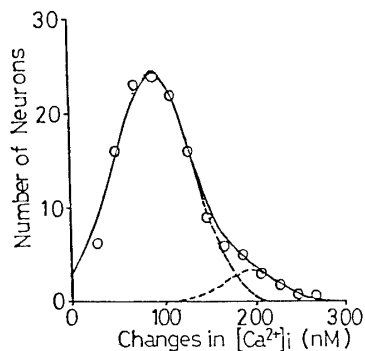


Fig. 7 Effect of IAP on the subsequent increase. The histogram of the maximum increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the subsequent increase was expressed by a sum of two normal distribution functions.

ものなのか区別できないためである。また121nM以上の細胞では形態学的につぶれていたり、まわりの細胞と情報のやりとりを行うための樹状突起がなく丸まってしまったものなど生きの悪いものも多く、反応が50nM以下であったり、大きな反応 ($\Delta [Ca^{2+}]_i = 400nM$ 以上)をしたあとそのまま $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したまま死にいたるなど正常な生理作用を行っていないと思われるためである。

さて2相性の変化はAPVにより抑制できることから、INC1およびINC2での $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はともにNMDAレセプターに関連したものであることは明らかである。またINC2は、NMDA投与終了後におこり、グリア組織の発育が悪い細胞では得られなかったことから、グリア組織に含まれる物質がINC2の発生に関与しているものと思われる。

NMDAにより誘起されるINC1は、Fig.6(a)に示したように $\Delta [Ca^{2+}]_i$ の頻度分布図が3個の正規分布関数の和で表現される。しかし平均値の大きい2個は平均値の小さいものと比べるとそのpeak値が15%以下

と小さく、ほとんど1個の正規分布関数とみなされる。INC1はNMDAチャネルを抑制する Mg^{2+} により抑制されることから、以前より報告¹³⁾されているNMDAチャネルに結合した Ca^{2+} チャネルを介する細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入により形成されているものと思われる。一方、NMDAにより誘起されるが、その投与終了後に起こるINC2の頻度分布図は2個の正規分布関数の和で表わされた。しかし、IAPを前処理することにより2個の正規分布のうち平均値が大きく、peak値の小さいほうが抑制された。またINC2における $\Delta [Ca^{2+}]_i$ の平均値もIAPにより40%抑制された。よって、INC2を形成する1要因はIAPにより抑制されるGTP結合タンパク質を介するものであることが示唆される。

NMDAによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がLTPの発生、維持に必須であることはすでに報告されている⁷⁾。本論文の結果に示すようにINC2がINC1に比べ約1.5倍と有意に大きく、長く続く反応であることを考慮すると、このように大きな $[Ca^{2+}]_i$ 変化をおこす機構がLTP発生に強く関与していることが予想される。

また近年、Goh⁸⁾らによって、IAPによりラット海馬スライス片でのLTPの発生が抑制されるということが報告⁸⁾され、GTP結合タンパク質がLTPの発生に重要な役割をはたしていることが指摘された。これらの研究結果と、我々が発見したNMDA投与後に誘起され、IAPによって抑制されるINC2とLTPとの関係の有無が今後の問題として興味ある。

5. まとめ

NMDAによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、 $3 \mu M$ 以上ではほとんどの細胞で2相性を呈した ($100 \mu M$ では90%以上)。その時のINC1は、 Ca^{2+} チャネルを介する細胞外から細胞内への Ca^{2+} の流入により形成されていると思われる。本研究により発見された、局所的なNMDA投与終了後に発生するINC2はその $[Ca^{2+}]_i$ の時間

変化の違いから、少なくとも2種以上のメカニズムにより形成されていると思われる。INC2におけるΔ[Ca²⁺]_iの頻度分布図は2個の正規分布関数の和で表わすことができた。この2個の分布はIAP処理により平均値の大きい方が強く抑制され、平均値も20%程抑制された。これよりINC2を形成する1要因はGTP結合タンパク質を介するものであると思われる。

参考文献

- 1) Y. Kudo, K. Ito, H. Miyakawa, Y. Izumi, A. Ogura and H. Kato: Brain Res., 407 168-172 (1987)
- 2) M. L. Mayer and G.L. Westbrook: Prog. Neurobiol., 28 197-216 (1987)
- 3) J.C. Watkins and R.H. Evans: Trends. Ann. Rev. Pharmac. Tox., 21 165-204 (1981)
- 4) T.V.P. Bliss and A.R. Gardner-Medwin: J. Physiol., 232 357-368 (1973)
- 5) T.V.P. Bliss and T. Lomo: J. Physiol., 232 331-356 (1973)
- 6) T.V.P. Bliss and A.C. Dolphin: Tr.neurosci., 5 289-290 (1982)
- 7) M. Baudry and G. Lynch: Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 81 2298-2302 (1980)
- 8) J.W. Goh and P.S. Pennefather: Science, 244 980-983 (1989)
- 9) H. Sugiyama, I. Ito and C. Hirono: Nature, 325 525-528 (1987)
- 10) 中林洋・駒田洋・中野洋・伊豆津公作, 細胞工学, 15 996-1003 (1986)
- 11) 中島一樹・三輪泰生・吉村利晴・新貝御蔵・原田有彦・岡田秀希・蛭名良雄, 山口大学工学部研究報告, 40 223-229 (1989)
- 12) R. Shingai, Y. Ebina, Satoshi. Nagaoka and K. Harada: Neurosci. Lett. (in press)
- 13) Y. kudo and A. Ogura: Br. J. Pharmacol., 89 191-198 (1986)

(平成2年10月15日受理)