

氏 名 Laxmi Kumar Parajuli

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1565 号

学位授与の日付 平成24年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Quantitative ultrastructural localization of voltage-gated
calcium channel subunits in the mouse brain

論文審査委員 主 査 教授 井本 敬二
教授 重本 隆一
准教授 窪田 芳之
教授 森 泰生 京都大学

論文内容の要旨

Multiple aspects of neuronal signaling in the brain are largely determined by the precise localization of ion channels in the neuronal plasma membrane.

There are numerous ion channels in the brain, each serving distinct roles. In neuronal cells, Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels (VGCC) are responsible for triggering plethora of subcellular responses such as exocytosis, plasticity, gene transcription etc. Despite these crucial roles, our fundamental understanding of the precise ultrastructural localization of VGCC lags behind that of other ion channels. Therefore, in order to obtain a more thorough understanding of the function(s) of VGCC in individual neurons and neuronal connections, it is important to know its precise localization in the brain.

To gain insight into subcellular distribution of VGCC, a number of studies have used techniques such as *in situ* hybridization, electrophysiological recordings and optical imaging. However, the technical limitations of these methods cannot provide a straightforward answer to the precise subcellular localization of VGCC. An obvious solution to this problem is to study VGCC localization at electron microscope (EM) level by means of subunit specific VGCC antibodies.

Appreciating the usefulness of EM techniques in revealing the neuronal distribution of VGCC, I have been using preembedding immunogold labeling technique in combination with serial section EM to study VGCC localization in the mouse brain. To this end, I have studied the subcellular distribution of the $\alpha 1\text{G}$ subunit of T-type VGCC (Parajuli et al., J Comp Neurol. 4362-4374; 2010), R-type VGCC (Parajuli et al., manuscript under revision), $\text{Ca}_v1.2$ VGCC (ongoing) and Beta subunits of VGCC (ongoing). In addition, I have also revealed the differential distribution of hyperpolarization cyclic nucleotide activated channel subunit 2 and 4 (HCN2 and HCN4) and their colocalization with $\alpha 1\text{G}$ subunit of T-type VGCC in the thalamus (Parajuli et al., manuscript in preparation). This thesis will focus on RTCC ($\text{Ca}_v2.3$) and TTCC ($\text{Ca}_v3.1$) localization results in the brain. The results from other VGCC subunits will be reported elsewhere after completion of respective studies.

The T-type calcium channel localization (TTCC) study (Parajuli et al., J Comp Neurol. 4362-4374; 2010) was the first to give a definitive picture on the localization of $\alpha 1\text{G}$ subunit of TTCC. Previous electrophysiological and computational studies have suggested that in order to achieve appropriate thalamic oscillations TCC must non-uniformly distributed along the somatodendritic axis of thalamic neurons. However, by extensive 3D reconstruction of immunogold labeled dendrites and somata, I revealed that TTCC are uniformly distributed along the somatodendritic neuronal compartments of

thalamic neurons. This immediately provokes an idea that non-uniform distribution of TTCC may not be a prerequisite for achieving thalamic oscillations.

In the $Ca_v2.3$ subunit of R-type calcium channel (RTCC) localization study, the author have made following interesting observations:

1. RTCCs are expressed ubiquitously in the brain with higher levels in the hippocampus, striatum, amygdala, cortex, interpeduncular nucleus than other regions.
2. RTCCs are expressed predominantly presynaptic in the interpeduncular nucleus but predominantly postsynaptic in other regions.
3. RTCCs found in dendritic shafts and spines showed a higher density compared to somata in CA1 of the hippocampus.
4. Individual spine heads of the CA1 of the hippocampus contained 0 - 16 $Ca_v2.3$ particles in adult mouse and 0 - 19 $Ca_v2.3$ particles in postnatal day 20 rat, which is consistent with the number of RTCCs reported previously (Sabatini and Svoboda, 2000).
5. The number of RTCCs in the CA1 of the hippocampus spine is positively correlated to the spine head volume.
6. The number of RTCCs is highly variable among individual spines in the CA1 of the hippocampus.
7. The average density of RTCCs in spine has no correlation to the density in the parent dendrite in the CA1 of the hippocampus.

On a technical note, most of the immunogold quantification data found in the literature is obtained from single section analysis of ultrathin sections. This method has several technical pitfalls and introduces a large quantification bias. However, in his study, He partially reconstruct a neuron and perform immunogold quantification in various membrane compartments of a neuron. This method is rather laborious and time consuming, but the quantification results are more reliable than that obtained from single section study.

In summary, my study provides detailed insight and fundamental knowledge of VGCC localization in the neurons.

博士論文の審査結果の要旨

電位依存性カルシウムチャネル(VDCC)は、神経細胞の興奮性の調節、樹状突起における情報の統合、神経終末からの神経伝達物質の放出、シナプス可塑性調節、遺伝子発現調節など多岐にわたる生理機能を担っている。VDCCには多くのサブタイプが存在し、薬理学的および生理学的解析からL-type, P/Q-type, N-type, R-type, T-typeに大別される。各サブタイプのチャネルポアを形成する α サブユニットの遺伝子は知られており、これらと異なる β サブユニット等によって形成されるイオンチャネルの機能や遺伝子変異による異常については数多くの研究がなされている。しかし有用な抗体が少ないことから、神経細胞上の各サブユニットの微細局在や密度分布についてはよく知られていない。脳におけるVDCCの生理機能を知るためには、各サブタイプが神経細胞体、樹状突起、軸索、神経終末などの異なる細胞膜コンパートメントにおいて、いかなる数と密度で発現しているかを調べるのが必須である。そこで、Parajuli氏は新たに作成されたR-typeとT-typeの α サブユニットに特異的な抗体を用いて、preembedding法による免疫電子顕微鏡法をマウス脳で行ない、一部の実験ではラット脳でも確認実験を行った。まず、R-typeチャネルを形成すると考えられているCav2.3について光学顕微鏡による免疫組織化学的検討を行ったところ、Cav2.3は脳の広い範囲に発現しており、特に海馬、線条体、扁桃核、大脳皮質、脚間核などに強い陽性像が認められた。これらの分布はin situ hybridization法によって知られているCav2.3 mRNAの分布と非常によく似ていたが、mRNAの発現が高い内側手綱核には免疫陽性像がほとんどなく、逆にmRNA発現が低い脚間核に強い免疫陽性像が認められた。内側手綱核の主要な投射先は脚間核であり、金標識免疫電子顕微鏡法によって高密度の標識が脚間核の神経終末に認められた。金標識は、神経終末の細胞膜に広範に認められ伝達物質放出部位にも同程度の密度で局在していた。この所見は、大部分が放出部位に密集しているCav2.1 (P/Q-type) と好対照をなし、伝達物質放出に果たす役割が異なることを示唆している。また海馬などそれ以外の脳領域では、大部分の金標識が細胞体や樹状突起に認められ、脚間核とは逆の分布様式を示した。海馬のCA1領域においては、Cav2.3の密度では細胞体よりも樹状突起で高かったが細胞体に近いapical dendriteとより遠位のoblique dendriteでは同程度の密度を示した。樹状突起スパインでは、スパイン体積と相関する数の金標識が認められたが、その値は0.19と大きなバラツキを示した。この金標識数はカルシウムイメージングから推定されていたR-typeチャネル数とほぼ同数であり、標識効率が極めて高いことを示していた。また、R-typeチャネルはスパインシナプスにおける長期増強現象(LTP)に必須であるという報告があるが、LTP発現は個々のスパインによって大きく異なることが知られており、R-typeチャネル数によってシナプス可塑性発現が調節されている可能性を示している。さらに、個々のスパインにおける金標識密度は、それらのスパインを持つ樹状突起における金標識密度と有意な相関がなく、独立した調節を受けていると考えられた。

Parajuli氏は、T-typeチャネルを形成する α サブユニットの一つであるCav3.1($\alpha 1G$)についても同様の解析を視床で行った。視床中継神経細胞でよく知られている周期的な発火には、T-typeチャネルの樹状突起に沿った密度勾配が必要であると言われているが、近位が高密度という報告と遠位が高密度という報告があり混乱していた。視床で強く発現しているCav3.1の免疫電子顕微鏡法による立体再構成を行ったところ金標識密度は樹状突起に

沿って均一であることが明らかになった。

以上のような Parajuli 氏の結果は、これまで困難とされてきた VDCC の電子顕微鏡レベルでの局在を定量的に明らかにし、多くの予想外の所見をもたらした。従って学位論文として十分なものである。