

氏 名 Dwi Wahyu Indriati

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1641 号

学位授与の日付 平成25年9月27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 localization of Cav2.1 (P/Q type calcium channel) in the rat cerebellum

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子
教授 深田 正紀
教授 川口 泰雄
教授 渡邊 雅彦 北海道大学
教授 重本 隆一 IST, Austria

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

More than ten thousand-fold calcium concentration gradient exists across neuronal plasma membrane, and openings of voltage dependent calcium channels (VDCCs) allow transient influx of Ca^{2+} that creates a distinct intracellular signal and precisely controls many cellular mechanisms. Due to diffusion and buffering, intracellular calcium signals rapidly collapses; thus, mechanisms dependent on such signal must be situated quite close to the site of influx. It is also well known that the membrane potential dynamics are not dictated solely by Na^+ and K^+ conductances but VDCCs can also contribute. For these reasons, subcellular localization of VDCCs is likely to be strategically arranged. Locations of VDCCs can be electrophysiologically hunted using outside-out patches but only from soma and large processes. Calcium imaging studies have visualized intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) but with resolution limited to sub-micrometer range. Important neuronal functions such as vesicular release depend on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase within tens of nanometers from the calcium influx source (calcium nanodomain) and only electron microscopy has this resolution. Here, we used highly sensitive SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL) for $\text{Ca}_v2.1$ subunit to visualize the two-dimensional distribution of P/Q-type VDCCs along the plasma membrane.

SDS-FRL method was developed by Fujimoto to visualize two-dimensional distribution of membrane molecules on freeze-fracture replicas. The brain tissue is frozen, freeze-fractured, shadowed with platinum-carbon and then replicated using carbon. The tissue beneath the replica is then dissolved with SDS, leaving the membrane proteins in the carbon-fixed membrane halves. Antibodies for the intracellular and extracellular domains can be applied to the membrane proteins separated on the protoplasmic face (P-face) and exoplasmic face (E-face), respectively. In my study, I used $\text{Ca}_v2.1$ antibody which specifically labeled both presynaptic and postsynaptic P-face in the rat cerebellum.

Among the various types of VDCCs, the P/Q-type ($\text{Ca}_v2.1$) has a prevailing role in a number of neuronal functions and is most abundant in Purkinje cells (PCs). The $\text{Ca}_v2.1$ channels play key roles in the generation of dendritic spikes after climbing fiber (CF) activation or strong parallel fiber (PF) activation and in the amplification of excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) in the distal dendrites. The $\text{Ca}_v2.1$ channels also have indispensable roles in the postnatal development of the cerebellar circuitry. $\text{Ca}_v2.1$ fuels heterosynaptic competition between CF and PF, and also homosynaptic competition among multiple CFs in developing cerebellum.

In this study, I found high density immunogold particles for $\text{Ca}_v2.1$ in the active zone of PF terminals consistent with a previous study. SDS-FRL revealed small clusters of $\text{Ca}_v2.1$ within the active zone. I also found localization of $\text{Ca}_v2.1$ in the active zone of

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

CF terminals. The number of particles within each active zone was comparable to that of functional channels deduced from previous reports, indicating high sensitivity of our labeling. The variability of $Ca_v2.1$ numbers among PF active zones was comparable to that of the size of PF synapses. In PCs, I found two distinct patterns of $Ca_v2.1$ distribution, scattered and clustered. Both populations of $Ca_v2.1$ were found as early as postnatal day 3 in which synapse arrangement takes place in developing cerebellum as shown by previous reports. These two populations of $Ca_v2.1$ were increased in the second postnatal week to a mature level. The scattered $Ca_v2.1$ had a somatodendritic gradient with the density of immunogold particles increasing 2.5-fold from soma to distal dendrites. This result explains previous calcium imaging studies showing higher $[Ca^{2+}]_i$ changes in the fine dendrites compared with the thicker dendrites during bursts of calcium spikes in PCs. The scattered $Ca_v2.1$ showed a high density in the periphery of PSD in PC spines, consistent with previous results. The other population with 74-fold higher density than the scattered particles was found within clusters of intramembrane particles (IMPs) on the P-face of soma and primary dendrites. These particular clusters of IMPs positive for $Ca_v2.1$ were also positive for two calcium-activated potassium channels, BK and SK2, with the nearest neighbor distance of 40 nm from $Ca_v2.1$. The calcium nanodomain created by opening of these $Ca_v2.1$ channels should fuel activation of both BK and SK2 channels, which underlies the characteristic after-hyper-polarization following calcium spikes in PCs and may result in bidirectional effects on PC excitability.

It has been shown that calcium channels have four different subunits, which are $\alpha1$, β , γ and $\alpha2\delta$. Direct interaction between $\alpha1$ and β subunits is mediated by well-defined sequence motifs on β (BID, β subunit interaction domain) and on the III cytoplasmic linker of $\alpha1$ (AID, alpha Interacting domain). The β subunits appear to participate in the membrane trafficking of the $\alpha1$ subunit. In the cerebellum, $\beta4$ is found to be abundant and could be coupled with $\alpha1A$ subunit ($Ca_v2.1$). In the present study, I showed that indeed $\beta4$ was colocalized with $Ca_v2.1$ in the active zone of parallel fiber terminals. These high resolution colocalization studies can give an insight into the characteristics and functional consequence of $Ca_v2.1$ activation in the cerebellum.

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

神経細胞膜を隔てた細胞内外においては、カルシウムイオンの濃度差が 10^4 倍以上に達し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口によって一過性かつ局所性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が生じる。このシグナルは、神経終末においては伝達物質の放出のトリガーとなり、樹状突起や細胞体においては興奮性の調節や遺伝子発現など多様な機能を仲介する。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞内カルシウムバッファーや拡散によって素早く消え去るため、カルシウムシグナルは電位依存性 Ca^{2+} チャネルからマイクロンあるいはナノメートル単位のドメイン内に存在する分子によって作用が発現すると考えられるが、 Ca^{2+} イメージングや電気生理学的な検出法では、ナノメートルの解像度を得ることは困難である。そこで Dwi Wahyu Indriati 氏の研究では、電子顕微鏡を用いることによって、ラット小脳での電位依存性カルシウムチャネルの神経細胞膜上の微細局在を定量的に解析した。一部の実験はマウスで行った。SDS-digested freeze-fracture replica labeling (SDS-FRL)法と P/Q-type の電位依存性 Ca^{2+} チャネルを構成する alpha サブユニット、Cav2.1 に特異的な抗体を用いることによって、プルキンエ細胞における高感度で二次元的な局在解析が可能となった。まず、平行線維—プルキンエ細胞シナプスの presynaptic active zone において、Cav2.1 の金標識数と過去の文献から推定される P/Q-type チャネル数との比較を行ったところ、今回の標識効率は 63-118%であると計算された。Cav2.1 は active zone 内で微小なクラスターを形成しており、active zone あたりの金標識数のばらつきはシナプスサイズのばらつきに対応していた。平行線維と登上線維シナプスの間では金標識数と分布様式に大きな差がなく、これらのシナプス間で知られている伝達物質放出確立の大きな違いには別の要因が関わっていると考えられる。また、平行線維シナプスにおいては、Cav2.1 は beta4 サブユニットと共存しており、共にクラスターを形成している様子が観察された。beta サブユニットは alpha サブユニットの細胞膜への輸送に関わっているとされており、wild-type mouse では beta4 サブユニットが小脳で強く発現しているが、beta4 knockout mouse でも Cav2.1 の数や分布様式に異常は認められなかったことから、別の beta サブユニットによる代償の可能性が考えられた。一方、プルキンエ細胞の細胞体や樹状突起においては、散在性とクラスター化した Cav2.1 が認められ、前者は細胞体から遠位樹状突起にかけて約 6 倍に上昇する密度勾配を示した。クラスター化した Cav2.1 は細胞体と近位樹状突起のうち細胞体に最も近い一次樹状突起のみで認められた。P/Q-type チャネルの活性化は Ca^{2+} 上昇によってカリウムチャネルである BK および SK2 チャネルを活性化することが知られていることから、これらの分子との共存を調べたところ、Cav2.1 で標識される膜内粒子のクラスターのほぼ 100%で BK および SK2 チャネルとの共存が認められた。クラスター内における Cav2.1 と BK および SK2 の金標識との最近傍距離(Nearest Neighbor Distance)を計測したところ、Cav2.1 と BK についてはランダムに、Cav2.1 と SK2 についてはランダムな分布よりも有意に近い距離で分布していることが明らかとなった。この結果は、SK2 チャネルが BK チャネルよりも Cav2.1 による活性化を受けやすいことを示しており、より速い時間経過でプルキンエ細胞の興奮性調節に関わっていることを示唆していると考えられた。最後に、プルキンエ細胞の Cav2.1 について生後発達を調べたところ、散在性とクラスター性 Cav2.1 とともに生後 1 週で既に発現しているが、生後 2 週目で成熟脳に近いレ

(Separate Form 3)

ベルまで発現が上昇することが明らかとなった。この時期には Cav2.1 依存性にプルキンエ細胞にシナプスを形成する登上線維のうち一本のみが強化され、他は除去されることが知られており、樹状突起のカルシウムスパイクと細胞体の興奮性制御の両者がシナプス除去に関わっている可能性があると考えられた。

以上の結果は、成熟小脳における主要な電位依存性 Ca^{2+} チャンネルである P/Q-type チャンネルの詳細かつ定量的な微細局在様式を初めて明らかにしたものであり、P/Q-type チャンネルの生理機能を考える上で重要な情報を提供していることから、学位論文として十分な内容を有していると判断された。