

開口分泌機構におけるシナプス蛋白と電位依存性カルシウムチャネル機能的複合体の解析

岡田元宏* 兼子直*
村上拓也* 朱剛*
鎌田晃寿* 河田祐子*

抄録：神経伝達物質の開口分泌機構解明を目的に、ラット海馬セロトニン（5-HT）遊離に対する電位依存性カルシウムチャネル（VSCC）、蛋白リン酸化酵素（PK）、シナプス蛋白（SNARE）の相互作用を microdialysis を用いて検討した。5-HT 基礎遊離は N 型 VSCC・PKC・syntaxin, P 型 VSCC・PKA・synaptobrevin 各阻害薬により濃度依存性に抑制された。Ca²⁺ 刺激性遊離は N 型 VSCC・PKC・syntaxin 阻害薬により濃度依存性に抑制されたが、P 型 VSCC・PKA・synaptobrevin 阻害薬は効果がなかった。K⁺ 刺激性遊離は N 型 VSCC・PKC・syntaxin 及び P 型 VSCC・PKA・synaptobrevin 阻害薬により抑制された。相互作用を検討した結果、基礎遊離は N 型 VSCC/PKC/syntaxin と P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin の機能的複合体により規定されていたが、N 型 VSCC/PKC/syntaxin が優位であった。Ca²⁺ 刺激性遊離は N 型 VSCC/PKC/syntaxin により規定され P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin 非感受性であった。K⁺ 刺激性遊離は N 型 VSCC/PKC/syntaxin と P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin の機能的複合体により規定されていたが、その感受性は P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin が有意に高かった。以上の結果は、PKC 活性亢進を介した N 型 VSCC と syntaxin の相互作用と、PKA を介した P 型 VSCC と synaptobrevin の相互作用により 5HT 遊離が規定されていることを示している。

精神薬療研究年報 第33集：28～37, 2001

Key words : serotonin, microdialysis, voltage-sensitive Ca²⁺ channel, protein kinase, SNARE

はじめに

神経伝達物質遊離の主体は開口分泌と考えられてきたが、この開口分泌機序は 1993 年に Sollner 等によって提唱された、N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor (SNARE) 仮説によって具体的な現象として認識されるに至った。この SNARE 仮説の中核は、“シナプス小胞に位置する SNARE (vSNARE) と神経細胞形質膜に位置する SNARE (tSNARE) による複合体が複雑な形成・分離を営み、この過程

が小胞膜と形質膜の結合・融合を誘導し開口分泌を発動する”と言うものであった (Sollner *et al.*²³⁾, 1993)。一方、SNARE 仮説以前から、電位依存性カルシウムチャネル (VSCC) を介した細胞外カルシウムの細胞内への流入が開口分泌機構発現のトリガーとして重要な機能を担うことは電気生理学的に証明されていた (Takahashi and Momiyama²⁶⁾, 1993 ; Wheeler *et al.*²⁹⁾, 1994)。Sudhof²⁵⁾ (1995) はこれらの実験事実を詳細に検討し、SNARE 仮説を再構築した。神経細胞の興奮（活動電位）がシナプス前終末部に到達し、終末部の電位変化を感

* 弘前大学・医学部・神経精神医学講座；〒 036-5862 弘前市在府町 5

* Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Hirosaki University, Zaifu-cho 5, Hirosaki, 036-5862, Japan.

Table 1 Summary of chemical agents and their action sites

Chemical (abbreviation)	Agents	Main target site and action	Other target sites and action	Reference
Voltage-sensitive Ca ²⁺ channels	(VSCCs)			
ω -conotoxin GVIA	(GVIA)	N-type VSCC inhibition (IC ₅₀ =100 nM)		(26)
ω -agatoxin IVA	(IVA)	P-type VSCC inhibition (IC ₅₀ =10 nM)	N-type VSCC inhibition (IC ₅₀ >500 nM)	(26)
Protein kinases (PKs)				
H-89		PKA inhibition (K _i =0.048 μ M)	PKC inhibition (K _i =31.7 μ M)	(4)
Chelerythrine	(CHR)	PKC inhibition (IC ₅₀ =0.66 μ M)	PKA inhibition (IC ₅₀ =170 μ M)	(6), (1)
Phorbol 12-myristate 13-acetate	(PMA)	PKC activation (nM orders)	Ca ²⁺ -ATPase activation	(13), (9)
Forskolin		Adenylate cyclase activation (EC ₅₀ =4 μ M)		(20)
SNAREs				
Botulinum toxin type A (BoNT/A)	SNAP-25 inhibition			(12)
Botulinum toxin type B (BoNT/B)	Synaptobrevin inhibition			(12)
Botulinum toxin type C (BoNT/C)	Syntaxin inhibition			(12)

受した電位依存性カルシウムチャネル (VSCC) が開口し、終末部活性帯への細胞外カルシウムの流入がトリガーとなり、各種酵素の活性亢進が SNARE 蛋白の複合体形成分離を発動するとした (Sudhof²⁵⁾, 1995)。

この SNARE 仮説は多くの研究者によって検証され、*in vitro* 環境下の SNARE 蛋白の複合体形成-分離が証明され、VSCC と SNARE 蛋白の相互作用は電気生理学的な実験により、グルタミン酸 (Glu) 系神経伝達物質遊離によって証明された (Pierce and Kalivas¹⁸⁾, 1997 ; Yokoyama *et al.*³⁰⁾, 1997)。しかし、精神疾患の病態に深く関与するモノアミン (MA) の遊離機構における SNARE 仮説の検証は未だ充分ではない。著者らは既に、MA 遊離は、遊離刺激トリガーの違いによって特異的に発現する VSCC-subtype に対する特異的感受性を有する複数の遊離機構で構成されていることを明らかにしている (Okada *et al.*¹⁵⁾, 1998)。この実験事実は、VSCC と SNARE の機能的複合体特性

の可能性を示すものであり、本研究では、ラット海馬セロトニン (5-HT) 遊離に対する VSCC, SNARE そしてこれら蛋白をリン酸化する蛋白リン酸化酵素 (PK) の機能的複合体の存在の可能性及び特異性の検証を試みた。

対象と方法

マイクロダイアリース

1.5%ハロセン吸入麻酔下の体重 250 ~ 300 g の雄性 Wistar 系ラット (クレア) の海馬 (A = -5.8 mm, L = 4.8 mm, V = -4.0 mm relative to bregma) にボツリヌス毒素 (BoNT) を溶解した 0.3 μ l の修正リンゲル液 (MRS) を微量注入した後に (Capogna *et al.*²⁾, 1997 ; Pierce and Kalivas¹⁸⁾, 1997), 透析プローブ (0.22 mm diameter ; 3 mm exposed membrane ; エイコム) を挿入した (Okada *et al.*¹⁶⁾, 1999a)。プローブ挿入 18 時間後に、流速 1 μ l/min で MRS [145 Na⁺, 2.7 K⁺, 1.2 Ca²⁺, 1.0 Mg²⁺, 154.4 Cl⁻ (in mM) 2 mM リン酸

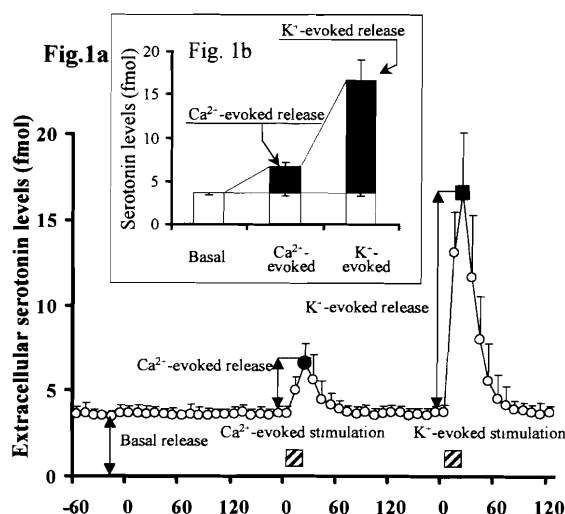


Fig. 1 Criteria for the levels of basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked hippocampal serotonin releases

1a : At least 6 h after starting the perfusion with MRS, the serotonin level in hippocampal perfusate was measured. After confirming the stabilisation of extracellular serotonin level, the serotonin level was measured for 120 min as control data (basal release). After determination of basal release, perfusion medium was switched to 3.4 mM Ca^{2+} including MRS for 20 min (Ca^{2+} -evoked stimulation) or 50 mM K^{+} including MRS for 20 min (K^{+} -evoked stimulation).

1b : The value of levels of Ca^{2+} - and K^{+} -evoked serotonin release was defined as the level of basal extracellular serotonin level subtracted from the maximal extracellular serotonin level during Ca^{2+} - and K^{+} -evoked stimulation, respectively.

緩衝液と 1.1 mM Tris 緩衝液で pH 7.40 に調整] 灌流を開始した (Okada et al.¹⁵⁾, 1998b). 10 分間隔で MRS を回収し ECD-HPLC を用いて MRS 内の 5-HT 濃度を測定した。測定値の安定化確認後、5-HT 基礎遊離量を測定し、続いて、3.4 mM Ca^{2+} 含有修正リング液 (HCMRS) 或いは 50 mM K^{+} 含有修正リング液 (HKMRS) を 20 分間灌流し、 Ca^{2+} 刺激性遊離、 K^{+} 刺激性遊離を測定した (Okada et al.¹⁴, 1998a)。

ECD-HPLC

5-HT 濃度測定には、ポンプ (EP-300, エイコム), graphite carbon 電極を装着した電気化学検出器 (ECD-300, エイコム) を用いた。分析カラムは、関東化学から提供された mightysil RP-18 (particle size 5 μm) を化学修飾し、マシス・弘前で 600 kg/cm² 以上の高圧充填したカラム (100 mm \times 1.5 mm internal diameter) を装着した。移動層の組成は、20 % メタノール, 900 mg/l オクタスルホン酸ナトリウム, 50 mg/l EDTA を含有した 0.1 M

リン酸緩衝液 (pH 5.9) とし、25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, 過電圧 450 mV に設定した (Okada et al.¹⁷⁾, 1999b)。

薬物投与

本研究で用いた, VSCC, PK, SNARE の各種阻害薬を Table 1 にまとめた。N 型 VSCC 阻害薬, ω -conotoxin GVIA (GVIA : ペプチド研究所, 大阪), P 型 VSCC 阻害薬, ω -agatoxin IVA (IVA : ペプチド研究所), PKA 阻害薬, H-89 (Calbiochem, San Diego, USA), PKC 作動薬, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA : ナカライテスク, 大阪), PKC 阻害薬, chelerythrine (CHR : Calbiochem), adenylate cyclase 作動薬, forskolin (ナカライテスク), SNAP-25 阻害薬, A 型 BoNT (BoNT/A : Calbiochem), synaptobrevin 阻害薬, BoNT/B (Calbiochem) and syntaxin 阻害薬, BoNT/C (Calbiochem) を用いた。

各種薬剤の投与方法は, BoNT は分子量 10,000 以上であり透析膜通過率が著しく低いため, プロ

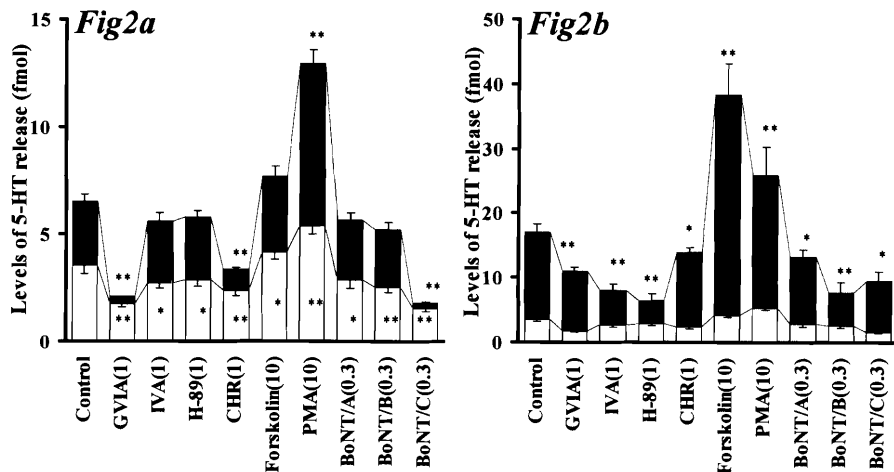


Fig. 2 Effects of VSCC inhibitors, PK inhibitors, PK activators and BoNTs on hippocampal basal serotonin release

The effects of inhibitors of VSCC, PK, activators of PK and BoNTs on the hippocampal basal (opened columns) and Ca^{2+} -evoked (closed columns) 5-HT releases are shown in Fig. 2a. The effects of inhibitors of VSCC, PK, activators of PK and BoNTs on the hippocampal basal (opened columns) and K^{+} -evoked (closed columns) 5-HT releases are shown in Fig. 2b. The ordinates indicate the mean \pm SD ($N = 6$) of levels of 5-HT release (fmol). The mean values obtained treatment with inhibitors of VSCC, PK, activators of PK and BoNTs and without (control) were compared by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

ープ挿入前に 0 或いは 0.3 ng BoNTs 含有 0.3 μl MRS を微量注入した。5-HT 基礎遊離量安定化確認後、VSCC 或いは PK 阻害薬を溶解した MRS を灌流投与し、測定値の安定化確認後、20 分間 Ca^{2+} 刺激或いは K^{+} 刺激を施行した (Okada *et al.*^{14,15}, 1998a, 1998b)。

結 果

各フラクションの 5-HT 含有量は 3.6 ± 0.4 fmol/10 μl であった。基礎実験では、 Na^{+} チャネル阻害薬 1 μM tetrodotoxin (TTX) 含有 MRS, Ca^{2+} -free MRS は細胞外 5-HT 濃度を 0.7 fmol/10 μl 以下に減少させ、20 分間 K^{+} 刺激は 13.7 ± 1.6 fmol/10 μl 増加した (Fig. 3A)。即ち、Westerink 等が提唱した microdialysis により回収された神経伝達物質遊離としての基準 (Westerink *et al.*²⁸, 1989) を満たし、本研究で測定した細胞外 5-HT 濃度は神経活動由来の基礎遊離と考えられた。また 20 分間 Ca^{2+} 刺激は 5-HT 遊離 3.0 ± 0.5 fmol/10 μl 増加した。基礎遊離、 Ca^{2+} 刺激性遊離、 K^{+} 刺激性遊離

の測定基準を Fig. 1 に示す。

5-HT 遊離に対する VSCC, PK, SNARE の効果

VSCC 阻害薬 (1 μM GVIA, IVA), PK 阻害薬 (1 μM H-89, CHR), PK 作動薬 (10 μM forskolin, PMA), SNARE 阻害薬 (0.3 ng BoNT/A, B, C) の 5-HT 基礎遊離, Ca^{2+} 刺激性遊離, K^{+} 刺激性遊離に対する効果を Fig. 2 に示す。基礎遊離を PK 作動薬 (forskolin, PMA) は有意に増加し、逆に VSCC, PK, SNARE 阻害薬全てが基礎遊離を阻害した。一方、 Ca^{2+} 刺激性遊離は GVIA, BoNT/C に有意に抑制され、PMA は有意に亢進したが、他の薬剤は効果がなかった。 K^{+} 刺激性遊離は、VSCC, PK, SNARE 阻害薬により有意に抑制され、PK 作動薬により有意に増加した。

PK 作動薬誘発性 5-HT 遊離増加に対する VSCC, SNARE 阻害薬の効果

PKA 作動薬 forskolin (10 μM) 誘発性 5-HT 基礎遊離, K^{+} 刺激性遊離増加に対する VSCC, SNARE 阻害薬の効果を Fig. 3 に、PKC 作動薬 PMA (10 μM) 誘発性 5-HT 基礎遊離, Ca^{2+} 刺激

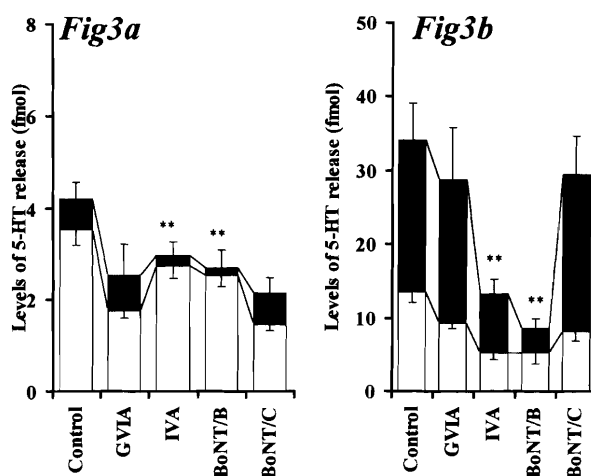


Fig. 3 Effects of VSCC inhibitors and BoNTs on forskolin induced 5-HT release.

The effects of VSCC inhibitors and BoNTs on the 10 μ M forskolin induced elevation of basal and K⁺-evoked 5-HT release are shown in Figs. 3a and 3b, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N = 6) of levels of 5-HT release (fmol). In order to study the effects of VSCC inhibitors on 10 μ M forskolin induced elevation of 5-HT release, after the microinfusion of 0.3 μ l MRS, the perfusion medium was switched from MRS containing without (control) or with VSCC inhibitors (opened columns) to the same MRS containing forskolin (closed columns) for 120 min. In order to study the effects of BoNTs on forskolin induced elevation of serotonin level, after the microinfusion without or with BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS (opened columns) to the same MRS containing 10 μ M forskolin (closed columns) for 120 min. The mean values obtained control (no treatment with VSCC inhibitor or BoNTs) and treatment with each agent were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (*: P < 0.05; **: P < 0.01).

性遊離, K⁺刺激性遊離増加に対する VSCC, SNARE 阻害薬の効果を Fig. 4 に示した。

Forskolin 誘発性 5-HT 基礎遊離を IVA, BoNT/B は有意に抑制したが, GVIA, BoNT/C は効果がなかった。Forskolin 誘発性 K⁺刺激性 5-HT 遊離増加も同様に, IVA, BoNT/B は有意に抑制し, GVIA, BoNT/C は効果がなかった。PMA 誘発性 5-HT 基礎遊離増加は GVIA, BoNT/C により有意に抑制され, IVA, BoNT/B には影響を受けなかった。PMA 誘発性 Ca²⁺刺激性及び K⁺刺激性 5-HT 遊離増加も同様に GVIA, BoNT/C により有意に抑制され, IVA, BoNT/B には影響を受けなかった。

5-HT 遊離に対する VSCC, SNARE 阻害薬の相互作用

5-HT 基礎遊離, Ca²⁺刺激性遊離, K⁺刺激性遊離に対する, VSCC 阻害薬と SNARE 阻害薬の相互作用を Fig. 5 に示した。

BoNT/B による synaptobrevin 機能抑制環境下

では, GVIA は基礎遊離, Ca²⁺刺激性遊離, K⁺刺激性遊離を抑制したが, IVA はこれら 3 種遊離に効果がなかった。BoNT/C による syntaxin 機能抑制環境下では, IVA は基礎遊離, Ca²⁺刺激性遊離, K⁺刺激性遊離を抑制したが, GVIA はこれら 3 種遊離に効果がなかった。

考 察

ラット海馬 5-HT 開口分泌における機能的複合体

ラット海馬 5-HT 遊離は, それぞれ遊離刺激条件に対して特異的に発現する開口分泌機構を介した基礎遊離, Ca²⁺刺激性遊離, K⁺刺激性遊離で構成されていることを本研究結果は示している。Ca²⁺刺激性遊離は N 型 VSCC, PKC, syntaxin によって規定される特異的な遊離形式であった。K⁺刺激性遊離は P 型 VSCC, PKA, synaptobrevin によって優位に規定され, これらと比較して軽度ではあるが, N 型 VSCC, PKC, syntaxin によっても

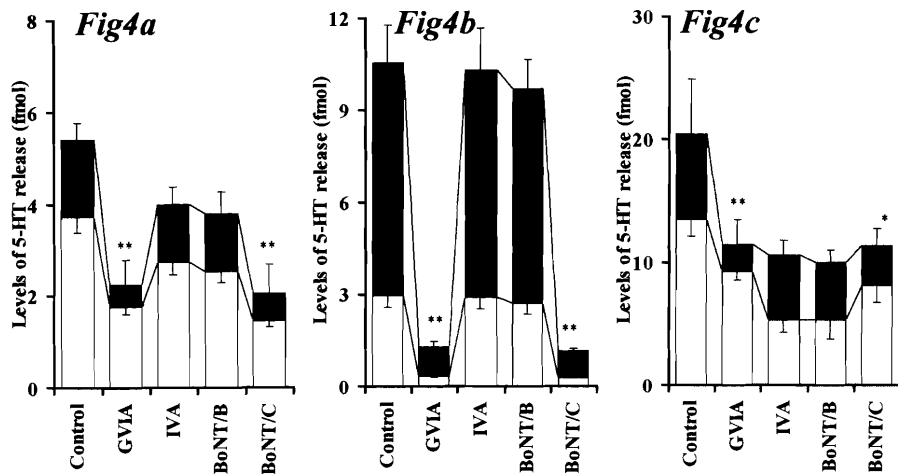


Fig. 4 Effects of VSCC inhibitors and BoNTs on PMA induced activation of 5-HT release

The effects of VSCC inhibitors and BoNTs on the 10 μ M forskolin induced elevation of basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked 5-HT release in Figs. 4a, 4b and 4c, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N = 6) of levels of 5-HT release (fmol). In order to study the effects of VSCC inhibitors on 10 μ M PMA induced elevation of 5-HT release, the perfusion medium was switched from MRS containing without (control) or with VSCC inhibitors (opened columns) to the same MRS containing PMA (closed columns) for 120 min. In order to study the effects of BoNTs on PMA induced elevation of 5-HT release, after the microinfusion without or with BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS (opened columns) to the same MRS containing 10 μ M PMA (closed columns) for 120 min. The mean values obtained control (no treatment with VSCC inhibitor or BoNTs) and treatment with each agent were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

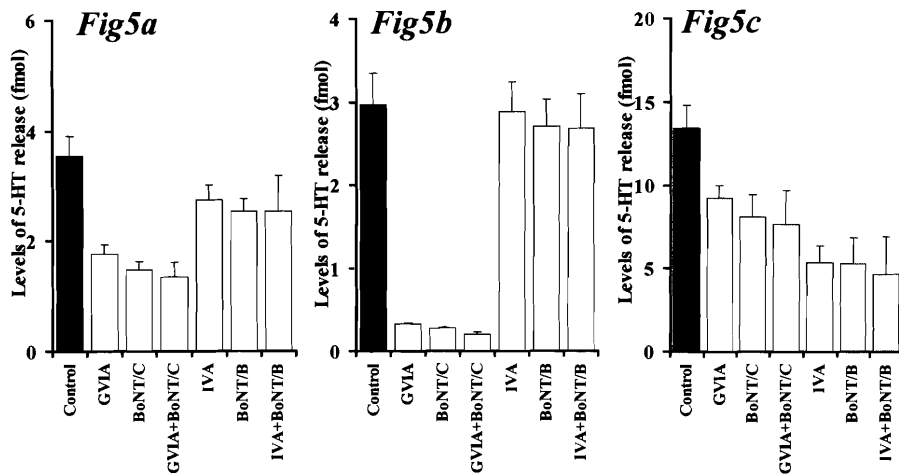


Fig. 5 Interaction between VSCC inhibitors and BoNTs on basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked serotonin release

The interaction between VSCC inhibitors and BoNTs on the basal, Ca^{2+} - and K^{+} -evoked serotonin release is shown in Figs. 5a, 5b and 5c, respectively. The ordinates indicate the mean \pm SD (N = 6) of level of 5-HT release (fmol). After the microinfusion with or without 0.3 ng BoNT/B and BoNT/C, the perfusion medium was switched from MRS containing without (control) or with 1 μ M GVIA or 1 μ M IVA. After the confirmation of stabilization of basal release, the perfusion medium was switched from the same MRS to HCMRS or HKMRS containing the same agents for 20 min. The mean values obtained control (no treatment with VSCC inhibitor or BoNTs) and treatment with each agent were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

規定されていた。基礎遊離は逆に N 型 VSCC, PKC, syntaxin によって優位に規定され、これらと比較して軽度ではあるが、P 型 VSCC, PKA, synaptobrevin によっても規定されていた。以上の結果から、少なくとも 5-HT 遊離には N 型 VSCC・PKC・syntaxin と P 型 VSCC・PKA・synaptobrevin の 2 種類の機能的複合体が存在している可能性が示唆される。PKC 作動薬 PMA は基礎遊離、 Ca^{2+} 刺激性遊離、 K^{+} 刺激性遊離全てを増加できるのに対して、adenylate cyclase 活性を亢進し PKA 活性を亢進する forskolin は基礎遊離、 K^{+} 刺激性遊離を増加できたが、 Ca^{2+} 刺激性遊離には効果がなかった。この PKC 活性亢進による基礎遊離、 Ca^{2+} 刺激性遊離、 K^{+} 刺激性遊離増加は、GVIA と BoNT/C で有意に抑制できたのに対して、IVA と BoNT/B は効果がなかった。逆に PKA 活性亢進による基礎遊離、 K^{+} 刺激性遊離増加は GVIA と BoNT/C は効果がなかったのに対して、IVA, BoNT/B は有意に抑制した。さらに、syntaxin 機能抑制では GVIA の抑制作用、synaptobrevin 機能抑制による IVA の抑制作用が発現し得なかった。以上の結果は、N 型 VSCC/PKC/syntaxin と P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin が密接に関連した、機能的複合体が存在することを示す。

N 型 VSCC 関連性開口分泌機構

電気生理学的検討から、P 型 VSCC が神経伝達に対して主要機能を有し、N 型 VSCC は補助的な機能を担っているに過ぎないと考えられてきた (Takahashi and Momiyama²⁶⁾, 1993 ; Luebke et al.¹⁰⁾, 1993 ; Wheeler et al.²⁹⁾, 1994)。しかし、本研究結果では、少なくとも 5-HT 基礎遊離では P 型 VSCC よりも N 型 VSCC が主要機構として機能していた。

1997 年に Sheng 等は SNARE 仮説をさらに発展させ、N 型 VSCC は Ca^{2+} 流入を担うトリガーとしてだけでなく、SNARE 蛋白複合体形成・分離にも参加し、開口分泌の主体的蛋白である可能性を示唆し、その詳細を synaptic protein interaction (synprint) 仮説としてまとめ上げた (Sheng et al.²²⁾, 1997)。N 型 VSCC は、syntaxin/SNAP-25 の 2 量体蛋白あるいは syntaxin/SNAP-25/synaptobrevin の 3 量体と神経伝達物質遊離トリガーと

同等の $10 \sim 30 \mu\text{M}$ で最大となる 2 相性 Ca^{2+} 濃度依存性結合する (Sheng et al.²¹⁾, 1996 ; Kim and Catterall⁷⁾, 1997)。一方、各 SNARE 蛋白と N 型 VSCC の結合は、syntaxin と SNAP-25 とは 2 量体と類似した Ca^{2+} 依存性に結合を示し、synaptotagmin とは Ca^{2+} 非依存性に結合 (Kim et al., 1997 ; Sheng et al.²²⁾, 1996), synaptobrevin とは結合しない (Sheng et al.²²⁾, 1996)。特にこの N 型 VSCC と syntaxin の結合は PKC 活性によって規定されるが PKA は関与し得ない (Yokoyama et al.³⁰⁾, 1997 ; Turner et al.²⁷⁾, 1999)。さらに、syntaxin と synaptotagmin も Ca^{2+} 濃度依存性に結合するが、これは $100 \mu\text{M}$ to 1mM の高濃度で結合能が最高となる (Chapman et al.³¹⁾, 1995 ; Li et al.⁸⁾, 1995)。即ち、本研究結果で示した、基礎遊離の一部と Ca^{2+} 依存性遊離は、N 型 VSCC を介して流入した Ca^{2+} 濃度増加が、N 型 VSCC 近傍の活性帯内に存在する syntaxin/SNAP-25/synaptobrevin 複合体と N 型 VSCC 結合を誘発し、形質膜と小胞の接近を図り、これにより synaptotagmin と N 型 VSCC が Ca^{2+} 濃度非依存性に結合可能な状態となる。さらに活性帯内の Ca^{2+} 濃度が増加すると、syntaxin/SNAP-25/synaptobrevin 複合体と N 型 VSCC の結合が解け、N 型 VSCC から解離した syntaxin が逆に synaptotagmin と結合し、小包膜と形質膜の接着が生じ、続いて融合・開口分泌へ進展する。以上の一連の機構により開口分泌されるものと推測される。

P 型 VSCC 関連性開口分泌機構

P 型 VSCC の synprint site は rbA と BI の 2 種類の存在が明らかとなっている (Starr et al.²⁴⁾, 1991 ; Mori et al.¹¹⁾, 1991)。これら rbA と BI の SNARE 蛋白との結合は N 型 VSCC とは異なる Ca^{2+} 濃度依存性を示す (Kim and Catterall⁷⁾, 1997)。BI は syntaxin, SNAP-25, synaptotagmin と Ca^{2+} 非依存的に結合する。rbA は synaptotagmin と Ca^{2+} 濃度依存的に、SNAP-25 とは濃度非依的に結合するが、syntaxin とは結合しない (Kim and Catterall⁷⁾, 1997)。また、synaptobrevin は synaptotagmin とは結合しないが (Schiavo et al.¹⁹⁾, 1997)、P 型 VSCC との結合は明らかではない。我々の microdialysis を用いた実験からも、ラット線条体の K^{+}

刺激性遊離はN型VSCCではなくP型VSCCによって規定されていた (Okada *et al.*¹⁴⁾, 1998a). シナプトゾームを用いた実験では, synaptobrevin機能抑制はK⁺刺激性dopamine遊離を抑制するが, Ca²⁺ ionophore ionomycin誘発性dopamine遊離には影響がなかった (Fassio *et al.*⁵⁾, 1999). これらの実験事実から, 脱分極誘発性5-HT遊離は少なくともVSCCとは異なる遊離トリガーが存在する可能性が示唆され, これは脱分極によるシナプス前膜のリン酸化を含めたラジカル化が関与しているかもしれない (Sheng *et al.*, 1998 ; Turner *et al.*²⁷⁾, 1999).

結 論

ラット海馬5-HT遊離は遊離刺激トリガーにより少なくとも基礎遊離, Ca²⁺刺激性遊離, K⁺刺激性遊離の3種に分類される. しかも, この遊離機構はN型VSCC/PKC/syntaxinとP型VSCC/PKA/synaptobrevinの2遊離機構機能的複合体が主要機構として関与していた. Ca²⁺刺激性遊離は, N型VSCC/PKC/syntaxinが構成し, P型VSCC/PKA/synaptobrevinは関与しなかった. K⁺刺激性遊離はN型VSCC/PKC/syntaxinとP型VSCC/PKA/synaptobrevinが関与していたが, P型VSCC/PKA/synaptobrevinが主要機構であった. 基礎遊離も同様に, N型VSCC/PKC/syntaxinとP型VSCC/PKA/synaptobrevinが関与していたが, N型VSCC/PKC/syntaxinが主要機構であった.

文 献

- 1) Barg J, Belcheva MM, Coscia CJ. Evidence for the implication of phosphoinositol signal transduction in μ -opioid inhibition of DNA synthesis. *J Neurochem*, 1992 ; 59 : 1145 ~ 1152.
- 2) Capogna M, McKinney RA, O'Connor V, Gahwiler BH, Thompson SM. Ca²⁺ or Sr²⁺ partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 7190 ~ 7202.
- 3) Chapman PF, Frenguelli BG, Smith A, Chen CM, Silva AJ. The α -Ca²⁺/calmodulin kinase II : a bidirectional modulator of presynaptic plastici-

ty. *Neuron* 1995 ; 14 : 591 ~ 597.

- 4) Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 5267 ~ 5272.
- 5) Fassio A, Sala R, Bonanno G, Marchi M, Raiteri M. Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F. *Neuroscience* 1999 ; 90 : 893 ~ 902.
- 6) Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 172 : 993 ~ 999.
- 7) Kim DK, Catterall WA. Ca²⁺-dependent and -independent interactions of the isoforms of the α_{1A} subunit of brain Ca²⁺ channels with presynaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 14782 ~ 14786.
- 8) Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RGW, Brose N, Sudhof TC. Ca²⁺-dependent and-independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 1995 ; 375 : 594 ~ 599.
- 9) Liu WS, Heckman CA. The seven-fold way of PKC regulation. *Cell Signal* 1998 ; 10 : 529 ~ 542.
- 10) Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 1993 ; 11 : 895 ~ 902.
- 11) Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991 ; 350 : 398 ~ 402.
- 12) Niemann H, Blasi J, Jahn R. Clostridial neurotoxins new tools for dissecting exocytosis. *Trends cell Biol* 1995 ; 4 : 179 ~ 185.
- 13) Oishi K, Yamaguchi M. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate on Ca²⁺-ATPase activity in rat liver nuclei. *J Cell Biochem* 1994 ; 55 : 168 ~ 172.
- 14) Okada M, Wada K, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Tasaki H, Kaneko S. Effects of Ca²⁺ channel antagonists on striatal dopamine and DOPA release, studied by *in vivo* microdialysis. *Br J Pharmacol* 1998a ; 123 : 805 ~ 814.

- 15) Okada M, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Kondo T, Kaneko S. Interaction between Ca^{2+} , K^+ , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br J Pharmacol* 1998b ; 124 : 1277 ~ 1285.
- 16) Okada M, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kondo T, Kaneko S. Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. *Eur J Neurosci* 1999a ; 11 : 1 ~ 9.
- 17) Okada M, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kaneko S. Interaction between purinoceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using *in vivo* microdialysis. *Neuropharmacology* 1999b ; 38 : 707 ~ 715.
- 18) Pierce RC, Kalivas PW. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 3254 ~ 3261.
- 19) Schiavo G, Stenbeck G, Rothman JE, Sollner TH. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 997 ~ 1001.
- 20) Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin : unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 3363 ~ 3367.
- 21) Sheng ZH, Rettig J, Cook T, Catterall WA. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* 1996 ; 379 : 451 ~ 454.
- 22) Sheng ZH, Yokoyama CT, Catterall WA. Interaction of the synprint site of N-type Ca^{2+} channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 5405 ~ 5410.
- 23) Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993 ; 362 : 318 ~ 324.
- 24) Starr TVB, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5621 ~ 5625.
- 25) Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle : a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995 ; 375 : 645 ~ 653.
- 26) Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993 ; 366 : 156 ~ 158.
- 27) Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci* 1999 ; 22 : 459 ~ 464.
- 28) Westerink BH, Damsma G, de Vries JB. Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the *in vivo* release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. *J Neurochem* 1989 ; 52 : 705 ~ 712.
- 29) Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 1994 ; 264 : 107 ~ 111.
- 30) Yokoyama CT, Sheng ZH, Catterall WA. Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 6929 ~ 6938.

ABSTRACT

Two functional complexes for exocytosis of hippocampal serotonin

Motohiro Okada*, Sunao Kaneko*, Takuya Murakami*, Gang Zhu*, Akihisa Kamata*, Yuko Kawata*

*Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Hirosaki University, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036-5862, Japan.

In order to clarify the mechanisms of neurotransmitter exocytosis, this study investigated the functional interactions among voltage-sensitive Ca^{2+} channels (VSCCs), protein kinases (PKs) and synaptic proteins (SNAREs) on hippocampal serotonin (5-HT) release using *in vivo* microdialysis in freely moving rat. Basal 5-HT release was regulated by two functional complexes, N-type VSCC (N-VSCC)/PKC/syntaxin (major pathway) and P-type VSCC (P-VSCC)/PKA/synaptobrevin (minor pathway). The K^{+} -evoked 5-HT release was regulated by N-VSCC/PKC/syntaxin (minor pathway) and P-VSCC/PKA/synaptobrevin (major pathway). However, the Ca^{2+} -evoked 5-HT release was regulated by N-VSCC/PKC/syntaxin, but was not affected by P-VSCC/PKA/synaptobrevin. These results suggest that the hippocampal 5-HT release is composed of multiple formations which are regulated by both functional complexes, N-VSCC/PKC/syntaxin and P-VSCC/PKA/synaptobrevin.

(Ann. Rep. Welfide Medicinal Res. Found. 2001, 33 : 28 ~ 37)