

## 前頭葉神経伝達物質開口分泌機構における機能的 synprint 蛋白複合体の解析

岡田元宏\* 朱剛\*  
村上拓也\* 鎌田晃久\*  
河田祐子\* 兼子直\*

**抄録:** 神経伝達物質開口分泌機構解明を目的に、ラット前頭葉における glutamate (GLU), dopamine (DA), serotonin (5-HT) の基礎・Ca<sup>2+</sup> 刺激性・K<sup>+</sup> 刺激性遊離に対する電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル (VSCCs), 蛋白リン酸化酵素 (PKs)・シナップス蛋白 (SNAREs) の効果を *in vivo* microdialysis を用いて検討した。基礎 monoamine (MA) 遊離は、N 型 VSCC (N-VSCC)/PKC/syntaxin 複合体と P 型 VSCC (P-VSCC)/PKA/synaptobrevin 複合体によって規定されていたが N-VSCC/PKC/syntaxin が主要機構であった。Ca<sup>2+</sup> 刺激性遊離は N-VSCC/PKC/syntaxin 複合体によって規定されていたが、P-VSCC/PKA/synaptobrevin の影響を受けていなかった。K<sup>+</sup> 刺激性遊離も基礎遊離同様に、P-VSCC/PKA/synaptobrevin と N-VSCC/PKC/syntaxin によって規定され、P-VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体が主要機構であった。一方 GLU の基礎・Ca<sup>2+</sup> 刺激性遊離は MA とは異なり、VSCC・PKA・SNARE 阻害薬の影響を受けなかったが、K<sup>+</sup> 刺激性遊離は、MA 同様に P-VSCC/PKA/synaptobrevin と N-VSCC/PKC/syntaxin によって規定されていたが、P-VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体が主要機構であった。本研究結果は、ラット前頭葉の神経伝達物質遊離は、少なくとも P-VSCC/PKA/synaptobrevin と N-VSCC/PKC/syntaxin の2系統の synprint 蛋白機能的複合体によって規定されている可能性を示唆した。

精神薬療研究年報 第34集: 4~20, 2002

**Key words:** dopamine, exocytosis, glutamate, serotonin, microdialysis, voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel, protein kinase, SNARE.

### 緒言

前頭葉の glutamate (GLU), dopamine (DA), serotonin (5-HT) の神経伝達系機能の障害が精神分裂病・感情障害・痙攣性障害などの中枢神経系機能性障害の病態に関与する可能性が、基礎的・臨床的研究によって示唆されている<sup>6,11,13,14,18)</sup>。しかし、これら神経伝達物質遊離が如何なる機序を介しているのか、そして同じ機構を介しているのかは未だ十分に理解されているとは言い難い。

一方、神経伝達物質遊離機構は、可溶性 N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor (SNARE) 仮説によって解釈されている。軸索を伝導してきた興奮は神経終末部に到達し、終末部の電位変化を感受した電位依存性カルシウムチャンネル (VSCCs) が開口し、Ca<sup>2+</sup> が終末部活性帯へ流入し<sup>1,4,10,22,23,25,39,40)</sup>、この Ca<sup>2+</sup> 流入がトリガーとなり、各種蛋白リン酸化酵素 (PKs) の活性化に伴い<sup>7,9,25,34,36,42,43)</sup>、神経終末部形質膜に結合している t-SNARE とシナップス小

\* 弘前大学・医学部・神経精神医学講座; 〒036-8562 弘前市在府町5

\* Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University, Hirosaki 036-8562, Japan.

胞に結合した v-SNARE の複合体形成・分離が発動された後に、形質膜と小包膜の接着・融合を経て開口分泌が生じると予想されている<sup>32,34</sup>。これまでの研究から、VSCC は L-, N-, O-, P-, Q-, R-, T-型の存在が示唆されているが、少なくとも、N 型及び P 型 VSCC が開口分泌のトリガー機構を司ることが証明されている<sup>1,22,25,35,38,39</sup>。また、PKs では PKC・PKA が VSCC と SNARE 蛋白の複合体形成・分離に対し何らかの作用を有することも明らかである<sup>7,9,25,34,36,42,43</sup>。

我々は、既にラット海馬 5-HT の遊離機構が、N 型 VSCC/PKC/syntaxin 複合体と P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体によって制御され、しかも基礎遊離は N 型 VSCC/PKC/syntaxin 複合体が主要制御機構であり、脱分極性遊離は P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体が主要制御機構である可能性を示唆した<sup>10,20,22,25</sup>。本研究ではラット前頭葉の GLU, DA, 5-HT の遊離機構を解析し、続いてこれら神経伝達物質遊離機構の差別化を試みた。

## 対象と方法

弘前大学動物実験施設で 12 時間の明暗サイクル（室温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ）で 1 週間以上飼育した、体重 250 ~ 300 g の雄性 Wistar 系ラット（Clea）を用い、弘前大学動物実験倫理委員会の承認を受け、弘前大学動物実験指針に基づき本実験を行った。

### Microdialysis

1.5 % ハロセン吸入麻酔下で前頭葉（A = +3.2 mm, L = +0.8 mm, V = -5.5 mm relative to bregma<sup>8</sup>）に botulinum toxin (BoNT) を溶解した 0.3  $\mu\text{L}$  の modified Ringer's solution (MRS) を微量注入した<sup>2,20,25,26</sup>。この後に、透析プローブ（0.22 mm diameter ; 3 mm exposed membrane ; Eicom : 京都）を挿入し<sup>22</sup>、プローブ挿入 18 時間後に、流速 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で修正リンゲル液（MRS）[145 Na<sup>+</sup>, 2.7 K<sup>+</sup>, 1.2 Ca<sup>2+</sup>, 1.0 Mg<sup>2+</sup>, 154.4 Cl<sup>-</sup> (in mM) 2 mM リン酸緩衝液と 1.1 mM Tris 緩衝液で pH 7.40 に調整] 灌流を開始した<sup>23</sup>。10 分間隔で MRS を回収し ECD-HPLC を用いて MRS 内の DA, 5-HT 濃度を測定し<sup>21,24,25</sup>、GLU 濃度測定には fluorescence-HPLC を用いた<sup>44</sup>。

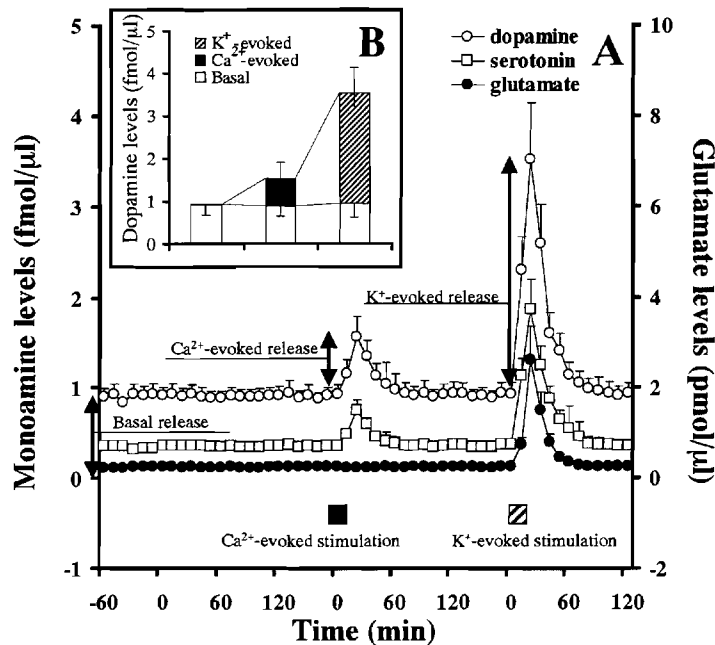
### 薬物投与

N-VSCC 阻害薬  $\omega$ -conotoxin GVIA (GVIA : ペプチド研究所, 大阪), P-VSCC 阻害薬  $\omega$ -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-type botulinum toxin (BoNT/A : Calbiochem), synaptobrevin 阻害薬 BoNT/B (Calbiochem), 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、プローブ挿入前に 0, 0.03, 0.3, 3 ng BoNTs 含有した MRS 0.3  $\mu\text{L}$  を微量注入した。MRS 灌流開始 6 時間後、灌流 MRS 内の DA, 5-HT, GLU 濃度測定を開始し、60 分間の CV 値 5 % 以下を安定化と定義した<sup>22</sup>。安定化確認後、control として DA, 5-HT, GLU 基礎遊離測定を 60 分間行った後に、各種薬剤を溶解した MRS に切り替え、更に測定値の安定化確認後、同様の薬剤を含有した 50 mM K<sup>+</sup> 含有 MRS (HKMRS) 灌流 (K<sup>+</sup> 刺激)、或いは 3.4 mM Ca<sup>2+</sup> 含有 MRS (HCMRS) 灌流 (Ca<sup>2+</sup> 刺激) を 20 分間施行した<sup>10,20,22,25</sup>。

## 結果

ラット前頭葉灌流 MRS 内の DA, 5-HT, GLU の含有量は  $0.91 \pm 0.16 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ ,  $0.35 \pm 0.04 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ ,  $0.24 \pm 0.06 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  であった。基礎実験では、Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬 1  $\mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX) 含有 MRS, Ca<sup>2+</sup>-free MRS 灌流により MRS 内 DA, 5-HT 含有量は 0.05 fmol/ $\mu\text{L}$  以下に減少し (data not shown), K<sup>+</sup> 刺激で有意に増加した (Fig. 1)。本実験で測定した MRS 内の DA, 5-HT 含有量は神経活動由来の DA, 5-HT 基礎遊離基準を満たしていた<sup>37</sup>。一方、GLU は TTX 及び Ca<sup>2+</sup>-free MRS 灌流に対して非感受性であったが (data not shown), K<sup>+</sup> 刺激で有意に増加した (Fig. 1)。各種神経伝達物質遊離の定量は、Kawata *et al.* (2001) の方法に従った (Fig. 1)<sup>10</sup>。



**Fig. 1** Criteria for the levels of basal,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate in pFC

**A :** At least 6 h after starting the perfusion with MRS, the levels of serotonin, dopamine and glutamate in pre-frontal cortex (pFC) perfusate were measured. After confirming the stabilisation of extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate, the levels of them were measured for 120 min as control data (basal release). After determination of basal release, perfusion medium was switched from MRS to HCMRS for 20 min ( $\text{Ca}^{2+}$ -evoked stimulation). After confirming the stabilisation of extracellular levels, perfusion medium was switched from MRS to HKMRS for 20 min ( $\text{K}^{+}$ -evoked stimulation).

**B :** The value of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked release (closed column) was defined as the level of basal extracellular level (basal release: opened columns) subtracted from the maximal extracellular level during  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked stimulation. The level of  $\text{K}^{+}$ -evoked release (stripped column) was also defined as the level of basal extracellular level subtracted from the maximal extracellular level during  $\text{K}^{+}$ -evoked stimulation.

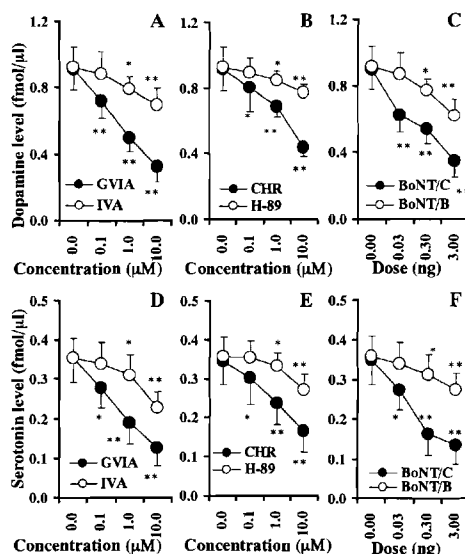
#### VSCCs, PKs, SNAREs 阻害薬の基礎遊離に対する効果

N 型 VSCC 阻害薬 GVIA と P 型 VSCC 阻害薬 IVA は DA・5-HT 基礎遊離を濃度依存性に抑制した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2A and 2D), そして GVIA の抑制効果は IVA よりも強力であった ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2A and 2D). PKC 阻害薬 CHR と PKA 阻害薬 H-89 も DA・5-HT 基礎遊離を濃度依存性に抑制し ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2B and 2E), この抑制効果は CHR が有意に強かった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B and 2E). SNARE 阻害薬は synaptobrevin 阻害薬 BoNT/B と syntaxin 阻害薬 BoNT/C は濃度依存性

に DA・5-HT 基礎遊離を抑制したが ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2C and 2F), BoNT/A 濃度非依存性に抑制した ( $P < 0.05$ ) (data not shown). BoNTs の抑制効果は BoNT/C > BoNT/B > BoNT/A の順に強力であった (Fig. 2C and 2F). GLU 基礎遊離は VSCCs, PKs, SNAREs 阻害薬に対して非感受性であった (data not shown).

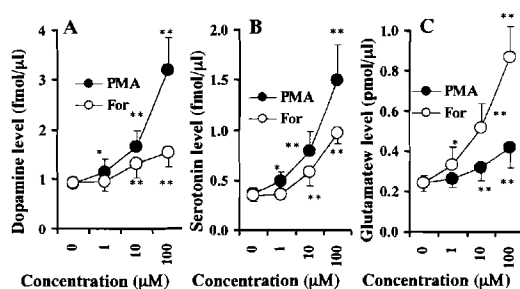
#### 基礎遊離に対する PKs 作動薬の効果

PKC 作動薬 PMA と PKA 活性を増強する forskolin は DA, 5-HT, GLU 基礎遊離を濃度依存性に増加した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3A-C). この増強効果は MA に対しては PMA が優位であったが



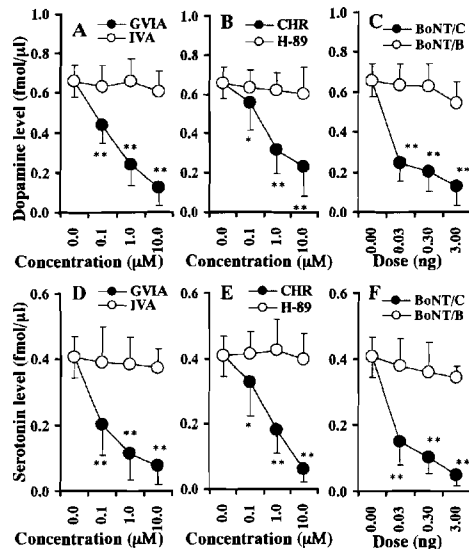
**Fig. 2** Effects of inhibitors of VSCCs, PKs and BoNTs on basal releases of serotonin and dopamine

The concentration-dependent effects of inhibitors of VSCCs, PKs and SNAREs on basal releases of dopamine and serotonin are shown in Fig. 2A-2C and 2D-2F, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of extracellular levels of dopamine or serotonin ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of inhibitors of VSCCs, PKs ( $\mu\text{M}$ ) or the dose of BoNTs ( $\text{ng}$ ). In order to study the effects of SNAREs inhibitors on basal monoamine release, the microinfusion of  $0.3 \mu\text{l}$  MRS containing with or without (control) BoNTs before insertion of microdialysis probe. In order to study the effects of inhibitors of VSCCs and PKs on basal monoamine release, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing GVIA, IVA, H-89 or CHR for 120 min. The effects of inhibitors of VSCCs, PKs and SNAREs on basal monoamine release were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).



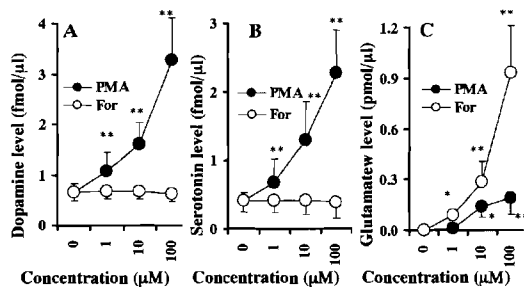
**Fig. 3** Effects of PKs activators on basal releases of dopamine, serotonin and glutamate

The concentration-dependent effects of PMA and forskolin (For) on basal releases of dopamine, serotonin and glutamate are shown in Fig. 3A, 3B and 3C, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of extracellular levels of monoamine ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ) or glutamate ( $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of PMA or For ( $\mu\text{M}$ ). In order to study the effects of PMA or For on basal releases of monoamine and glutamate, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing PMA or For for 120 min. The effects of PMA and For on basal releases were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).



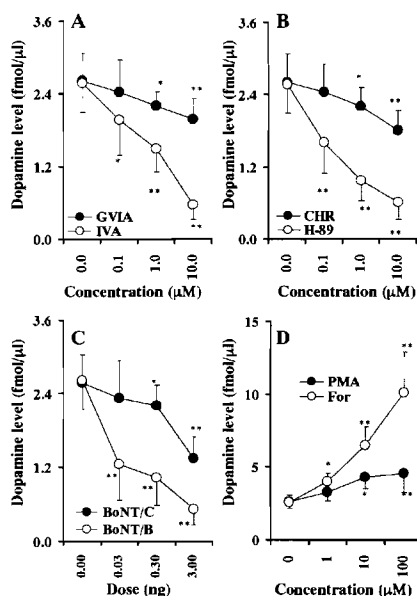
**Fig. 4** Effects of inhibitors of VSCCs, PKs and SNAREs on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of dopamine and serotonin

The concentration-dependent effects of inhibitors of VSCCs, PKs and SNAREs on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of dopamine and serotonin are shown in Fig. 4A-4C and 4D-4F, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of levels of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of dopamine and serotonin ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of inhibitors of VSCCs, PKs ( $\mu\text{M}$ ) or the dose of BoNTs (ng). In order to study the effects of SNAREs inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked monoamine release, the microinfusion of  $0.3 \mu\text{l}$  MRS containing with or without (control) BoNTs before insertion of microdialysis probe. In order to study the effects of inhibitors of VSCC and PK on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked monoamine release, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing with or without GVIA, IVA, H-89 or CHR. After the confirmation the stabilization of basal release, the perfusion medium was switched to HCMRS containing the same agents. The effects of inhibitors of VSCCs, PKs and SNAREs on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked monoamine release were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).



**Fig. 5** Effects of PKs activators on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate

The effects of PMA and forskolin (For) on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate are shown in Fig. 5A, 5B and 5C, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of levels of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases of monoamine ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ) or glutamate ( $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of PMA or For ( $\mu\text{M}$ ). In order to study the effects of PMA and For on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked monoamine release, the perfusion medium was switched from MRS containing with or without PMA or For. After the confirmation the stabilization of basal release, the perfusion medium was switched to HCMRS containing the same agents for 20 min. The effects of PMA and For on  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked releases were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).



**Fig. 6** Effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on  $K^+$ -evoked dopamine release

The concentration-dependent effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on the  $K^+$ -evoked dopamine release are shown in Fig. 6A, 6B, 6C and 6D, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of  $K^+$ -evoked dopamine release ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of VSCC inhibitors, PK inhibitors and activators ( $\mu\text{M}$ ) or the dose of BoNTs (ng). In order to study the effects of BoNTs on  $K^+$ -evoked dopamine release, the microinfusion of 0.3 ng BoNT/B or BoNT/C. In order to study the effects of SNAREs inhibitors on  $K^+$ -evoked dopamine release, the microinfusion of 0.3  $\mu\text{l}$  MRS containing with or without (control) BoNTs before insertion of microdialysis probe. In order to study the effects of inhibitors of VSCCs, PKs and PKs activators on  $K^+$ -evoked dopamine release, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing with or without GVIA, IVA, H-89, CHR, PMA or forskolin (For). After the confirmation the stabilization of basal release, the perfusion medium was switched to HKMRS containing the same agents for 20 min. The effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on  $K^+$ -evoked dopamine release were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

( $P < 0.01$ ) (Fig. 3A and 3B), 逆に GLU では forskolin の増強効果が優位であった ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3C).

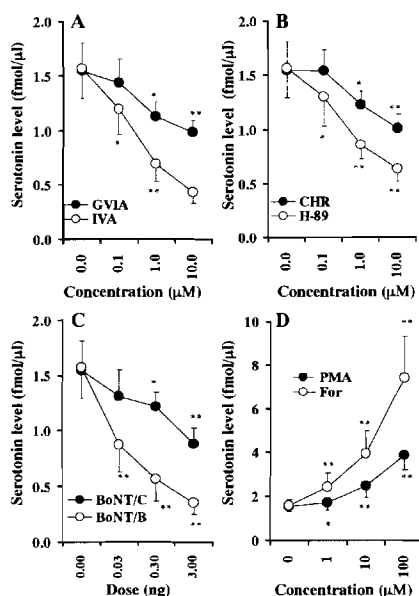
#### VSCCs, PKs, SNAREs 阻害薬の $\text{Ca}^{2+}$ 刺激性遊離に対する効果

$\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1.2 から 3.4 mM へ増加した透析液を 20 分間灌流刺激 ( $\text{Ca}^{2+}$  刺激) によって, DA, 5-HT 遊離は増加したが ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1), GLU 濃度の増加は観察できなかった (Fig. 1). GVIA は  $\text{Ca}^{2+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離を濃度依存性に抑制した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4A and 4D), しかし, IVA は効果がなかった (Fig. 4A and 4D). CHR は

$\text{Ca}^{2+}$  刺激性遊離を濃度依存性に抑制したが ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4B and 4E), H-89 は効果がなかった (Fig. 4B and 4E). BoNT/C は  $\text{Ca}^{2+}$ -刺激性 DA, 5-HT 遊離を濃度依存性に抑制したが ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4C and 4F), BoNT/A 及び BoNT/B は効果がなかった (Fig. 4C and 4F).

#### PKs 作動薬の $\text{Ca}^{2+}$ 刺激性遊離に対する効果

PMA は  $\text{Ca}^{2+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離を濃度依存性に増加したが ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5A and 5B), forskolin は効果がなかった (Fig. 5A and 5B).  $\text{Ca}^{2+}$ -刺激では GLU 遊離の変化はなかったが (Fig. 1 and 5C), しかし forskolin と PMA の前処



**Fig. 7** Effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on  $K^+$ -evoked serotonin release

The concentration-dependent effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on the  $K^+$ -evoked serotonin release are shown in Fig. 7A, 7B, 7C and 7D, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of  $K^+$ -evoked serotonin release ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ), and abscissas show the concentration of VSCC inhibitors, PK inhibitors and activators ( $\mu\text{M}$ ) or the dose of BoNTs (ng). In order to study the effects of BoNTs on  $K^+$ -evoked serotonin release, the microinfusion of 0.3 ng BoNT/B or BoNT/C. In order to study the effects of SNAREs inhibitors on  $K^+$ -evoked serotonin release, the microinfusion of 0.3  $\mu\text{l}$  MRS containing with or without (control) BoNTs before insertion of microdialysis probe. In order to study the effects of inhibitors of VSCCs, PKs and PKs activators on  $K^+$ -evoked serotonin release, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing with or without GVIA, IVA, H-89, CHR, PMA or forskolin (For). After the confirmation the stabilization of basal release, the perfusion medium was switched to HKMRS containing the same agents for 20 min. The effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on  $K^+$ -evoked serotonin release were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

置は濃度依存性に  $\text{Ca}^{2+}$  刺激性 GLU 遊離を増強した ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5C). この増強効果は forskolin 優位であった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5C).

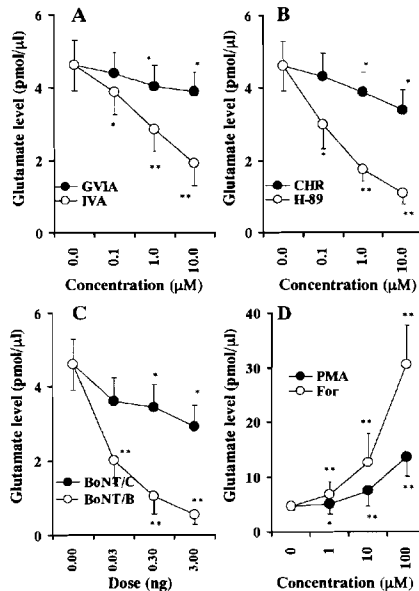
#### VSCCs, PKs, SNAREs 阻害薬の $K^+$ 刺激性遊離に対する効果

GVIA・IVA は  $K^+$  刺激性 DA, 5-HT, GLU 遊離を濃度依存性に抑制し ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6A, 7A and 8A), その抑制効果は IVA 優位であった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6A, 7A and 8A). CHR・H-89 は  $K^+$  刺激性 DA, 5-HT, GLU 遊離を濃度依存性に抑制し ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6B, 7B and 8B), その抑制効果は H-89 優位であった ( $P < 0.05$ ) (Fig.

6B, 7B and 8B). BoNT/B・BoNT/C は  $K^+$  刺激性 DA, 5-HT, GLU 遊離を濃度依存性に抑制し ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6C, 7C and 8C), BoNT/A も抑制したが濃度非依存性であった. 抑制効果は BoNT/B が BoNT/A・BoNT/C よりも優位であった ( $P < 0.01$ ) (Fig. 6C, 7C and 8C).

#### PKs 作動薬の $K^+$ 刺激性遊離に対する効果

PMA・forskolin は  $K^+$  刺激性 DA, 5-HT, GLU 遊離を濃度依存性に亢進したが ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6D, 7D and 8D), この亢進効果は forskolin 優位であった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 6D, 7D and 8D).



**Fig. 8** Effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on K<sup>+</sup>-evoked glutamate release

The concentration-dependent effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on the K<sup>+</sup>-evoked glutamate release are shown in Fig. 8A, 8B, 8C and 8D, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of K<sup>+</sup>-evoked glutamate release (pmol/ $\mu$ l), and abscissas show the concentration of VSCC inhibitors, PK inhibitors and activators ( $\mu$ M) or the dose of BoNTs (ng). In order to study the effects of BoNTs on K<sup>+</sup>-evoked glutamate release, the microinfusion of 0.3 ng BoNT/B or BoNT/C. In order to study the effects of SNAREs inhibitors on K<sup>+</sup>-evoked glutamate release, the microinfusion of 0.3  $\mu$ l MRS containing with or without (control) BoNTs before insertion of microdialysis probe. In order to study the effects of inhibitors of VSCCs, PKs and PKs activators on K<sup>+</sup>-evoked glutamate release, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing with or without GVIA, IVA, H-89, CHR, PMA or forskolin (For). After the confirmation the stabilization of basal release, the perfusion medium was switched to HKMRS containing the same agents. The effects of inhibitors of VSCCs, PKs, SNAREs and PKs activators on K<sup>+</sup>-evoked glutamate release were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

#### VSCCs・SNAREs阻害薬のPKs作動薬誘発性基礎遊離増強に対する効果

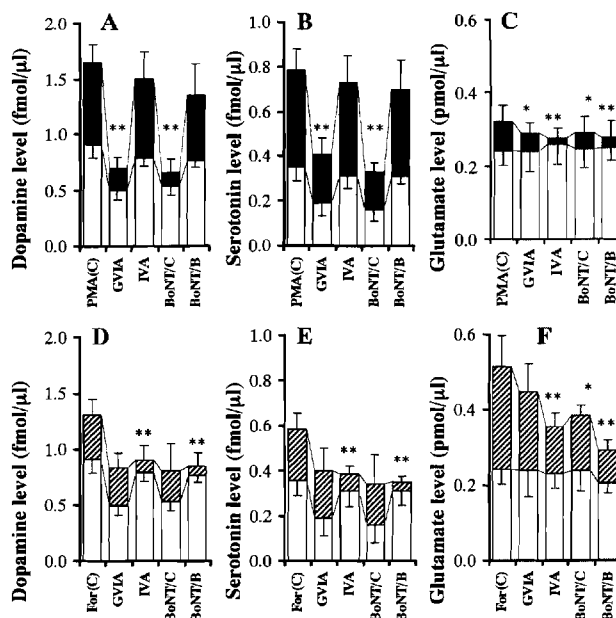
10  $\mu$ M PMA 誘発性 DA, 5-HT 基礎遊離増強は 1  $\mu$ M GVIA と 0.3 ng BoNT/C によって抑制されたが ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M IVA と 0.3 ng BoNT/B は効果がなかった (Fig. 9A and 9B). 一方, 10  $\mu$ M forskolin 誘発性 DA, 5-HT 基礎遊離増強は, 1  $\mu$ M IVA と 0.3 ng BoNT/B によって抑制され ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M GVIA・0.3 ng BoNT/C は効果がなかった (Fig. 9D and 9E). 1  $\mu$ M IVA 及び 0.3 ng BoNT/B は 10  $\mu$ M PMA・forskolin 誘発性 GLU 遊離を抑制した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 9C and 9F). 1

$\mu$ M GVIA 及び 0.3 ng BoNT/C は 10  $\mu$ M PMA 誘発性 GLU 遊離を抑制したが ( $P < 0.05$ ), 10  $\mu$ M forskolin 誘発性 GLU 遊離には効果がなかった (Fig. 9C and 9F).

#### VSCCs・SNAREs阻害薬のPKs作動薬誘発性Ca<sup>2+</sup>刺激性遊離増強に対する効果

10  $\mu$ M PMA 誘発性 Ca<sup>2+</sup>刺激性 DA, 5-HT 遊離は 1  $\mu$ M GVIA・0.3 ng BoNT/C によって抑制されたが ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M IVA と 0.3 ng BoNT/B は効果がなかった (Fig. 10A and 10B). 10  $\mu$ M PMA 誘発性 Ca<sup>2+</sup>刺激性 GLU 遊離は 1  $\mu$ M IVA・GVIA 及び 0.3 ng BoNT/B・BoNT/C を抑





**Fig. 9** Effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PKs activators-induced elevation of basal releases of dopamine, serotonin and glutamate

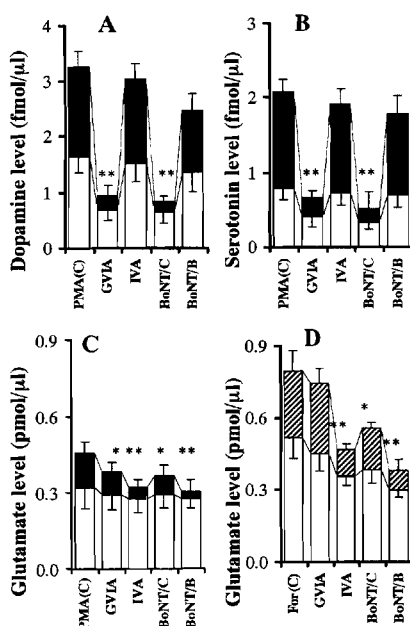
The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on the 10  $\mu$ M PMA or 10  $\mu$ M forskolin (For) induced elevation of basal releases of dopamine, serotonin and glutamate are shown in Fig. 9A-9C and Fig. 9D-9F, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of extracellular levels of monoamine (fmol/ $\mu$ l) or glutamate (pmol/ $\mu$ l). In order to study the effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PKs activators-induced elevation of monoamine and glutamate releases, after the microinfusion of 0.3  $\mu$ l MRS dissolved with or without (C) 0.3 ng BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS containing without (C) or with 1  $\mu$ M GVIA or 1  $\mu$ M IVA (opened columns) to the same MRS containing PMA (closed columns) or For (stripped columns) for 120 min. The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PK activators-induced elevation of basal releases of monoamine and glutamate were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

制したが ( $P < 0.05$ ), この抑制効果は 1  $\mu$ M IVA 及び BoNT/B 優位であった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10C). 10  $\mu$ M forskolin は  $Ca^{2+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離に効果がなかった (Fig. 5A, 5B). 10  $\mu$ M forskolin 誘発性  $Ca^{2+}$  刺激性 GLU 遊離は 1  $\mu$ M IVA 及び 0.3 ng BoNT/B により強力に抑制され ( $P < 0.01$ ), 0.3 ng BoNT/C により軽微ではあるが有意に抑制されたが ( $P < 0.05$ ), 1  $\mu$ M GVIA は効果がなかった (Fig. 10D).

#### VSCCs・SNAREs 阻害薬の PKs 作動薬誘発性 $K^{+}$ 刺激性遊離増強に対する効果

10  $\mu$ M PMA 誘発性  $K^{+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離増強は 1  $\mu$ M GVIA と 0.3 ng BoNT/C により抑制さ

れたが ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M IVA と 0.3 ng BoNT/B は効果がなかった (Fig. 11A and 11B). 10  $\mu$ M forskolin 誘発性  $K^{+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離増強は 1  $\mu$ M IVA と 0.3 ng BoNT/B によって抑制されたが ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M GVIA と 0.3 ng BoNT/C は効果がなかった (Fig. 11D and 11E). The 10  $\mu$ M PMA 誘発性  $K^{+}$  刺激性 GLU 遊離増強は 1  $\mu$ M GVIA・IVA 及び 0.3 ng BoNT/B・BoNT/C により抑制されたが ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11C), 10  $\mu$ M forskolin 誘発性  $K^{+}$  刺激性 GLU 遊離増強は 1  $\mu$ M IVA 及び 0.3 ng BoNT/B により有意に抑制され ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ M GVIA・0.3 ng BoNT/C は効果がなかった (Fig. 11F).



**Fig. 10** Effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PKs activators-induced elevation of Ca<sup>2+</sup>-evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate

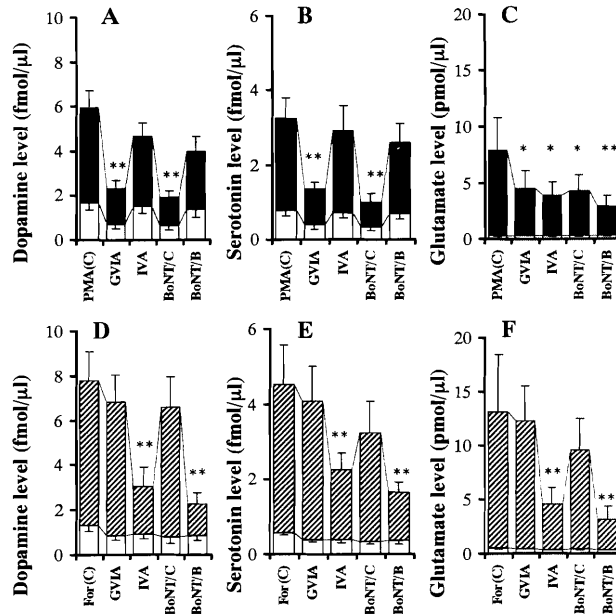
The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on the 10  $\mu$ M PMA induced elevation of Ca<sup>2+</sup>-evoked releases of dopamine and serotonin are shown in Fig. 10A and 10B, respectively. The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on the 10  $\mu$ M PMA or 10  $\mu$ M forskolin (For) induced elevation of Ca<sup>2+</sup>-evoked glutamate releases are shown in Fig. 10C and 10D, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD (N = 6) of levels of Ca<sup>2+</sup>-evoked releases of monoamine (fmol/ $\mu$ l) or glutamate (pmol/ $\mu$ l). After the microinfusion of 0.3  $\mu$ l MRS dissolved with or without (C) 0.3 ng BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing without (C) or with 1  $\mu$ M GVIA or IVA. After the confirming the stabilization, the perfusion medium was added 10  $\mu$ M PMA or For (opened columns). After the confirming the stabilization of levels of monoamine and glutamate, the perfusion medium was switched to HCMRS containing 10  $\mu$ M PMA (closed columns) or For (stripped column) for 20 min. The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PKs activators-induced elevation of Ca<sup>2+</sup>-evoked releases of monoamine and glutamate were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01).

#### VSCCs 阻害薬と BoNTs の基礎遊離・Ca<sup>2+</sup>刺激性・K<sup>+</sup>刺激性遊離に対する相互作用

0.3 ng BoNT/C 前処置環境下では、1  $\mu$ M GVIA は基礎・Ca<sup>2+</sup>刺激性・K<sup>+</sup>刺激性 DA, 5-HT 遊離に対して効果がなかった (Fig. 12A, B, C), しかし、同環境下で、1  $\mu$ M IVA は基礎・K<sup>+</sup>刺激性 DA, 5-HT 遊離を抑制した (P < 0.05) (data not shown). 0.3 ng BoNT/B 前処置環境下では、1  $\mu$ M IVA は基礎・Ca<sup>2+</sup>刺激性・K<sup>+</sup>刺激性 DA, 5-HT 遊離に対して効果がなかったが (Fig. 12A, B, C), 1  $\mu$ M GVIA は基礎・Ca<sup>2+</sup>刺激性・K<sup>+</sup>刺激性 DA, 5-HT

遊離を抑制した (P < 0.05) (data not shown).

0.3 ng BoNT/C 前処置環境下では、1  $\mu$ M GVIA は K<sup>+</sup>刺激性 GLU 遊離を抑制したが (P < 0.05). 0.3 ng BoNT/B 前処置環境下では、1  $\mu$ M IVA は K<sup>+</sup>刺激性 GLU 遊離に対して効果がなかった (Fig. 12C), また BoNT/B と GVIA, そして BoNT/C と IVA の K<sup>+</sup>刺激性 GLU 遊離に対する抑制効果は相加的であった (data not shown).



**Fig. 11** Effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PKs activators-induced elevation of  $K^+$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate

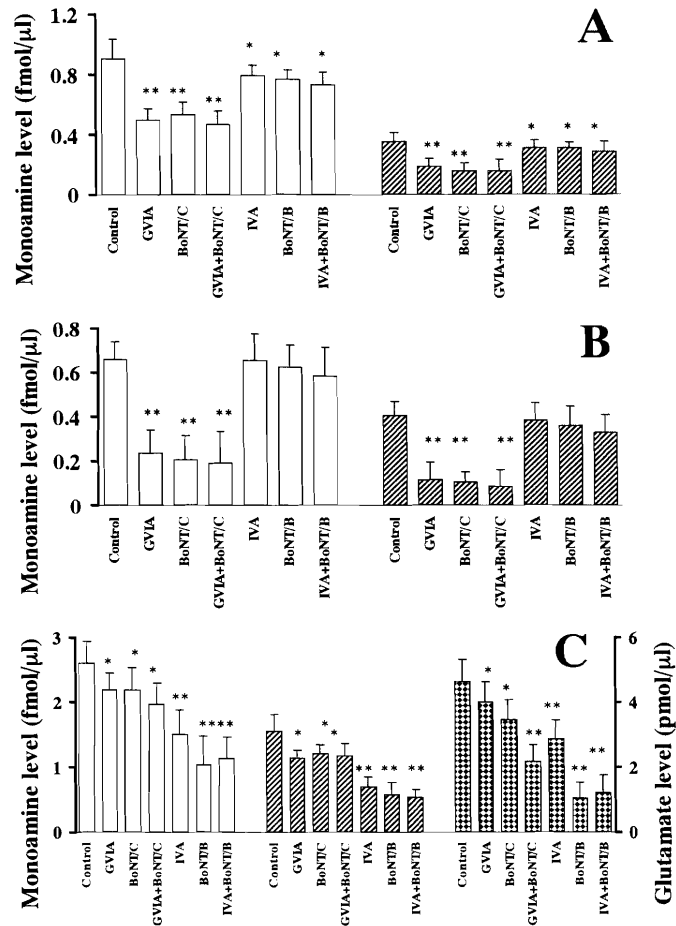
The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on the 10  $\mu M$  PMA or 10  $\mu M$  forskolin (For) induced elevation of  $K^+$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate are shown in Fig. 11A-11C and 11D-11F, respectively. The ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of levels of  $K^+$ -evoked releases of monoamine (fmol/ $\mu l$ ) or glutamate (pmol/ $\mu l$ ). After the microinfusion of 0.3  $\mu l$  MRS dissolved with or without (C) 0.3 ng BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS to MRS containing without (C) or with 1  $\mu M$  GVIA or IVA. After the confirming the stabilization, the perfusion medium was added 10  $\mu M$  PMA or For (opened columns). After the confirming the stabilization of levels of monoamine and glutamate, the perfusion medium was switched to HKMRS containing 10  $\mu M$  PMA (closed columns) or For (stripped column) for 20 min. The effects of inhibitors of VSCCs and SNAREs on PK activators-induced elevation of  $K^+$ -evoked releases of monoamine and glutamate were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

## 考 察

### MA 開口分泌機構

前頭葉 DA, 5-HT 基礎遊離は TTX  $\cdot$   $Ca^{2+}$   $\cdot$   $K^+$  感受性を示し, 神経活動を反映した遊離であり, しかも基礎  $\cdot$   $Ca^{2+}$  刺激性  $\cdot$   $K^+$  刺激性 DA, 5-HT 遊離は特異的な機構によって制御されている可能性が示唆される。基礎 DA, 5-HT 遊離は N 型 VSCC 阻害薬 GVIA  $\cdot$  PKC 阻害薬 CHR  $\cdot$  syntaxin 阻害薬 BoNT/C によって有意に抑制され, P 型 VSCC 阻害薬 IVA  $\cdot$  PKA 阻害薬 H-89  $\cdot$  synaptobrevin 阻害薬 BoNT/B によって微弱ではあるが

有意に抑制された。  $Ca^{2+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離は GVIA  $\cdot$  CHR  $\cdot$  BoNT/C によって抑制されたが, IVA  $\cdot$  H-89  $\cdot$  BoNT/B は効果が無かった。対照的に,  $K^+$  刺激性 DA, 5-HT 遊離は, IVA  $\cdot$  H-89  $\cdot$  BoNT/B によって有意に抑制され, GVIA  $\cdot$  CHR  $\cdot$  BoNT/C によって微弱ではあるが抑制された。これらの結果から, 前頭葉 DA, 5-HT 遊離は海馬 5-HT と類似した, 基礎及び  $Ca^{2+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離を主に制御する N 型 VSCC/PKC/syntaxin 複合体と, 脱分極性 DA, 5-HT 遊離を抑制する P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体機構<sup>25)</sup>によって開口分泌が制御されている可能性が示唆さ



**Fig. 12** Interaction between inhibitors of VSCCs and SNAREs on basal,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked releases of dopamine, serotonin and glutamate

The interaction between inhibitors of VSCCs and SNAREs on the basal,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked releases of dopamine (opened columns), serotonin (stripped columns) and glutamate (dotted columns) are shown in Fig. 12A, 12B and 12C, respectively. The left side ordinates indicate the mean  $\pm$  SD ( $N = 6$ ) of levels of monoamine releases ( $\text{fmol}/\mu\text{l}$ ), and right side ordinate indicates the levels of glutamate release ( $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ). After the microinfusion with or without (control) 0.3 ng BoNTs, the perfusion medium was switched from MRS containing without (control) or with 1  $\mu\text{M}$  GVIA or IVA. After the confirmation of stabilization of basal release, the perfusion medium was switched 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 agents were compared using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

れる。

PKC 作動薬 PMA の基礎・ $\text{Ca}^{2+}$  刺激性・ $\text{K}^{+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離増強は GVIA・BoNT/C によって特異的に抑制され, IVA・H-89 は効果が無く, 逆に forskolin 誘発性基礎・ $\text{K}^{+}$  刺激性 DA, 5-

HT 遊離増強を IVA・H-89 が特異的に抑制し, GVIA・CHR の効果が無く, 更に, BoNT/C が GVIA の, BoNT/B が IVA の基礎・ $\text{Ca}^{2+}$  刺激性・ $\text{K}^{+}$  刺激性 DA, 5-HT 遊離抑制効果を阻害した。相互作用からも, この仮説は支持される。

### GLU 開口分泌機構

前頭葉 GLU 基礎遊離は TTX・Ca<sup>2+</sup>に対して非感受性であったが、K<sup>+</sup>刺激性遊離は TTX・Ca<sup>2+</sup>感受性であった。VSCCs・PKs・SNAREs 各種阻害薬は GLU 基礎遊離に効果が無かった。K<sup>+</sup>刺激性遊離は IVA・H-89・BoNT/B によって有意に抑制され、GVIA・CHR・BoNT/C は軽微な抑制を示した。本研究で得られた GLU 基礎遊離自体は神経活動を反映した細胞外 GLU 濃度とは断定できない。しかし、少なくとも各種刺激による細胞外 GLU 濃度増加は開口分泌機構を反映した物であると考えられる。以下にその根拠となる実験事実を列挙する。VSCCs・PKs・SNAREs 各種阻害薬とは対照的に、PMA・forskolin は GLU 基礎遊離を増強し、しかもこれら薬剤による PKs 活性化進環境下でのみ Ca<sup>2+</sup>刺激性遊離が観察された。この PMA 誘発性基礎・Ca<sup>2+</sup>刺激性 GLU 遊離は、MA とは逆に、IVA・BoNT/B によって有意に抑制され、GVIA・BoNT/C の抑制効果は軽微であった。forskolin 誘発性基礎 GLU 遊離は、MA 同様に IVA・BoNT/B によって有意に抑制された。更に、MA では観察されなかった forskolin 誘発性 Ca<sup>2+</sup>刺激性 GLU 遊離増強は、基礎 GLU 遊離同様に IVA・BoNT/B によって有意に抑制された。これらの実験結果は、基礎・Ca<sup>2+</sup>刺激性 GLU 遊離は、MA 遊離とは異なる開口分泌機構により制御されている可能性が示唆される。K<sup>+</sup>刺激性 GLU 遊離は PMA・forskolin により増強されたが、PMA の増強作用は GVIA・IVA・BoNT/B・BoNT/C により抑制され、forskolin の増強作用は IVA・BoNT/B に有意に抑制、BoNT/C により軽微に抑制、そして GVIA は効果が無かった。これらの結果から、MA 同様に N 型 VSCC/PKC/syntaxin と P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin 複合体が GLU 開口分泌制御に参加していると予想されるが、GLU 開口分泌機構自体が P 型 VSCC/PKA/synaptobrevin への感受性が高く、N 型 VSCC/PKC/syntaxin は二次的な機能しか有していない可能性が示唆される。

### N 型 VSCC 関連性開口分泌機構

従来の電気生理学的研究業績から、多くの研究者が神経伝達物質遊離には P 型 VSCC 機能が優位

で、N 型 VSCC 機能は補助的機能を果たしているに過ぎないと考えられてきた<sup>17)35)38)</sup>。しかし、これらの研究は主に GLU 神経伝達系機能を神経伝達物質遊離と仮定して検討されたものであり、本研究も同様に前頭葉 GLU 遊離系では、N 型 VSCC の制御機能は P 型 VSCC と比較して軽微な物であった。しかし、前頭葉 MA 遊離では、海馬 5-HT 遊離同様に<sup>25)</sup>、基礎遊離・Ca<sup>2+</sup>刺激性遊離は逆に N 型 VSCC/PKC/syntaxin 複合体に対して、より高い感受性を示し、むしろ P 型 VSCC が補助的な機能を果たしているに過ぎなかった。

**Synaptic protein interaction (synprint) 仮説**<sup>30)</sup>では、N 型 VSCC の  $\alpha$  サブユニットは、syntaxin・SNAP-25 単体、syntaxin/SNAP-25 の 2 量体、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 ~ 30  $\mu$ M で最大となる、Ca<sup>2+</sup>濃度依存性 2 相性結合が報告されている<sup>12)29)</sup>。この相互作用は、PKC によって制御されているが、PKA は関与していない<sup>36)41)</sup>。一方、synaptotagmin と N 型 VSCC の  $\alpha$  サブユニットは Ca<sup>2+</sup>非依存性に結合し<sup>12)29)</sup>、synaptobrevin とは結合しない<sup>29)</sup>。さらに、syntaxin と synaptotagmin も Ca<sup>2+</sup>濃度依存性に結合するが、これは 100  $\mu$ M ~ 1 mM の高濃度で結合能が最高となる<sup>3)16)</sup>。即ち、本研究結果で示した、基礎遊離の一部と Ca<sup>2+</sup>依存性遊離は、N 型 VSCC を介して流入した Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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  $\alpha$  サブユニットである  $\alpha_{1A}$  は rba と BI、二つのイソタイプの存在が知られているが<sup>19)33)</sup>、rba と BI では synprint 蛋白との結合様式

が異なる<sup>12)</sup>。BIはsyntaxin, SNAP-25, synaptotagminと $\text{Ca}^{2+}$ -非依存性に結合する。逆にrbAはsynaptotagminと $\text{Ca}^{2+}$ -依存性に結合し、SNAP-25とは $\text{Ca}^{2+}$ -非依存性に結合するが、syntaxinとは結合しない<sup>12)</sup>。 $\alpha_{1A}$ サブユニットとsynaptobrevinの結合は未だ確認されていない<sup>28)</sup>。しかし、synaptobrevin機能阻害は $\text{K}^+$ 刺激性5-HT遊離を抑制するが<sup>25)</sup>、 $\text{Ca}^{2+}$ -ionophoreであるionomycin誘発性のDA遊離には効果が無い<sup>5)</sup>。我々の過去の検討でも、N型VSCCは線条体DA及び海馬5-HT基礎遊離を有意に制御していたが、脱分極性遊離はP型VSCCが有意な制御を示していた<sup>22,25)</sup>。本研究結果だけでは、イソタイプの機能的差別化の検証は困難であるが、少なくとも、脱分極性遊離制御機構としてP型VSCC/PKA/synaptobrevin複合体はN型VSCC/PKC/syntaxin複合体よりも有意な機能を果たしていることは明らかである。加えて、過剰興奮による神経伝達物質遊離は、基礎遊離とは異なり、未知の $\text{Ca}^{2+}$ -依存性機構の存在が示唆され、さらに過剰興奮による神経細胞の形質膜の二次的リン酸化の関与も示唆されており<sup>31,36)</sup>、今後の検討が必要である。

細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の活性帯への流入が如何なる機構を介して、開口分泌のトリガーとなりうるのか、加えて $\text{Ca}^{2+}$ に対する低感受性センサーとして知られているsynaptotagminの機能も同様に詳細不明である<sup>17)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ -依存性calmodulinがsynaptobrevinと( $K_d = 0.5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -濃度)で結合し、syntaxin/SNAP-25/synaptobrevinの3量体結合が $\text{Ca}^{2+}$ -依存性calmodulinによって抑制されることが明らかとなった<sup>27)</sup>。本研究で、PMAのDA、5-HT基礎遊離・ $\text{Ca}^{2+}$ -刺激性遊離増強に効果が無く、IVA・BoNT/BがGLU遊離増強を抑制したが、この相違は、MA遊離には関与しない $\text{Ca}^{2+}$ -依存性calmodulin関連性のGLU開口分泌を特異的に制御する機構が存在する可能性を示唆するものである。

## 文 献

- 1) Bergquist F, Jonason J, Pileblad E, Nissbrandt H. Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the striatum and the substantia nigra: a microdialysis study in rat. *J Neurochem*, 1998; 70: 1532 ~ 1540.
- 2) Capogna M, McKinney RA, O'Connor V, Gahwiler BH, Thompson SM.  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Sr}^{2+}$  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  $\alpha$ - $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II: a bidirectional modulator of presynaptic plasticity. *Neuron*, 1995; 14: 591 ~ 597.
- 4) Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci*, 1995; 18: 89 ~ 98.
- 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) Ghoneim MM, Hinrichs JV, Mewaldt SP, Petersen RC. Ketamine: behavioral effects of subanesthetic doses. *J Clin Psychopharmacol*, 1985; 5: 70 ~ 77.
- 7) Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW. Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem*, 1999; 274: 6195 ~ 6202.
- 8) Ichikawa J, Meltzer HY. Valproate and carbamazepine increase prefrontal dopamine release by 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol*, 1999; 380: R1 ~ 3.
- 9) Kaneko S, Akaike A, Satoh M. Differential regulation of N- and Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by cyclic nucleotides and G-proteins. *Life Sci*, 1998; 62: 1543 ~ 1547.
- 10) Kawata Y, Okada M, Murakami T, Kamata A, Zhu G, Kaneko S. Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^+$ -evoked serotonin release. *Br J Pharmacol*, 2001; 33: 557 ~ 567.
- 11) Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 1994; 51: 199 ~ 214.
- 12) Kim DK, Catterall WA.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and -independent interactions of the isoforms of the  $\alpha_{1A}$

1) Bergquist F, Jonason J, Pileblad E, Nissbrandt H. Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the striatum and the substantia nigra: a microdialysis study in rat. *J*

- subunit of brain  $\text{Ca}^{2+}$  channels with presynaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 ; 94 : 14782 ~ 14786.
- 13) Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1995 ; 13 : 9 ~ 19.
  - 14) Lahti AC, Holcomb HH, Medoff DR, Tamminga CA. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport*, 1995 ; 6 : 869 ~ 872.
  - 15) Leveque C, Boudier JA, Takahashi M, Seagar M. Calcium-dependent dissociation of synaptotagmin from synaptic SNARE complexes. *J Neurochem*, 2000 ; Jan ; 74 (1) : 367 ~ 374
  - 16) Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RGW, Brose N, Südhof TC.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature*, 1995 ; 375 : 594 ~ 599.
  - 17) Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron*, 1993 ; 11 : 895 ~ 902.
  - 18) Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. NMDA receptor function and human cognition : the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 1996 ; 14 : 301 ~ 307.
  - 19) 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.
  - 20) Murakami T, Okada M, Kawata Y, Zhu G, Kamata A, Kaneko S. Determination of effects of antiepileptic drugs on SNARE-mediated hippocampal monoamine release using *in vivo* microdialysis. *Br J Pharmacol*, 2001 ; 134 : 507 ~ 520.
  - 21) Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Tasaki H, Kaneko S. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J Neurochem*, 1997 ; 69 : 2581 ~ 2588.
  - 22) Okada M, Wada K, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Kondo T, Tasaki H, Kaneko S. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ -channel antagonists on striatal dopamine and DOPA release, studied by *in vivo* microdialysis. *Br J Pharmacol*, 1998 ; 123 : 805 ~ 814.
  - 23) Okada M, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Kondo T, Kaneko S. Interaction between  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br J Pharmacol*, 1998 ; 124 : 1277 ~ 1285.
  - 24) 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*, 1999 ; 11 : 1 ~ 9.
  - 25) Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, Kaneko S. Adenosine Receptor Subtypes Modulate Two Major Functional Pathways for Hippocampal Serotonin Release. *J Neurosci*, 2001 ; 21 : 628 ~ 640.
  - 26) Pierce RC, Kalivas PW. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci*, 1997 ; 17 : 3254 ~ 3261.
  - 27) Quetglas S, Leveque C, Miquelis R, Sato K, Seagar M.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 ; Aug 15 ; 97 (17) : 9695 ~ 9700.
  - 28) 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.
  - 29) 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.
  - 30) Sheng ZH, Yokoyama CT, Catterall WA. Interaction of the synprint site of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 ; 94 : 5405 ~ 5410.
  - 31) Sheng ZH, Westenbroek RE, Catterall WA. Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg Biomembr*, 1998 ; 30 : 335 ~ 345.
  - 32) 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.
  - 33) 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*, 1993 ; 90 : 1111 ~ 1116.

- Sci USA, 1991 ; 88 : 5621 ~ 5625.
- 34) Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle : a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 1995 ; 375 : 645 ~ 653.
  - 35) Takahashi, T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, 1993 ; 366 : 156 ~ 158.
  - 36) Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci*, 1999 ; 22 : 459 ~ 464.
  - 37) 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.
  - 38) 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.
  - 39) Wu LG, Borst JG, Sakmann B. R-type  $Ca^{2+}$  currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 ; 95 : 4720 ~ 4725.
  - 40) Wu LG, Westenbroek RE, Borst JGG, Catterall WA, Sakmann B. Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *J Neurosci*, 1999 ; 19 : 726 ~ 736.
  - 41) 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.
  - 42) Yoshihara M, Ueda A, Zhang D, Deitcher DL, Schwarz TL, Kidokoro Y. Selective effects of neuronal-synaptobrevin mutations on transmitter release evoked by sustained versus transient  $Ca^{2+}$  increases and by cAMP. *J Neurosci*, 1999 ; 19 : 2432 ~ 2441.
  - 43) Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha 1$  subunit. *Nature*, 1997 ; 385 : 442 ~ 446.
  - 44) Zhu G, Okada M, Murakami T, Kamata A, Kawata Y, Wada K, Kaneko S. Dysfunction of M-channel enhances propagation of neuronal excitability in rat hippocampus monitored by multielectrode dish and microdialysis systems. *Neurosci Lett*, 2000 ; 294 : 53 ~ 57.



## ABSTRACT

### **Pharmacological differences in exocytosis mechanisms between dopamine, serotonin and glutamate in rat prefrontal cortex**

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

\* Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University, Hirosaki 036-8562, Japan.

In order to explore the mechanisms of exocytosis of glutamate and monoamine, this study determined the functional interactions among voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VSCCs), protein kinases (PKs) and synaptic proteins (SNAREs) on releases of glutamate, dopamine and serotonin in prefrontal cortex (pFC), using *in vivo* microdialysis in freely moving rats. Basal monoamine release was regulated by two functional complexes, the N-type VSCC (N-VSCC)/PKC/syntaxin (major pathway) and the P-type VSCC (P-VSCC) /PKA/synaptobrevin (minor pathway).  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked monoamine release was regulated by N-VSCC/PKC/syntaxin but was unaffected by P-VSCC/PKA/synaptobrevin. Basal glutamate release was unaffected by both either functional complexes, and  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked stimulation unaffected glutamate release. Activators of PKA and PKC increased basal and produced  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked glutamate releases, but surprisingly these stimulatory actions were reduced by inhibitors of P-VSCC and synaptobrevin predominantly, and inhibitors of N-VSCC and syntaxin weakly.  $\text{K}^{+}$ -evoked neurotransmitter release was regulated by P-VSCC/PKA/synaptobrevin (major pathway) and N-VSCC/PKC/syntaxin (minor pathway). These results indicate two possibilities regarding exocytosis of glutamate and monoamine in pFC, ie. the first is that the neurotransmitter release is composed of multiple formations each induced by a specific trigger. The other is that two functional complexes, N-VSCC/PKC/syntaxin and P-VSCC/PKA/synaptobrevin, regulate both the releases of glutamate and monoamine mainly, but the sensitivity of each neurotransmitter to these complexes is different.

(Ann. Rep. Mitsubishi Pharma Res. Found. 2002, 34 : 4 ~ 20)