

ウシガエル交感神経節のニコチン性シナプス伝達に対するアラキドン酸の抑制作用

箕田昇一, 渡邊定博

神戸市看護大学, 基礎医学系

Inhibition of Nicotinic Synaptic Transmission by Arachidonic Acid in Bullfrog Sympathetic Ganglion Cells.

Shoichi MINOTA and Sadahiro WATANABE

Division of Basic Medical Science,
Kobe City College of Nursing

Abstract

The effects of arachidonic acid (AA) on the nicotinic responses mediated through the activation of nicotinic receptor-channel complex were examined in bullfrog sympathetic neurons. AA (20 μ M) reversibly reduced the amplitude of the fast excitatory postsynaptic potentials and underlying currents evoked by preganglionic nerve stimulation in a Ca^{2+} -deficient solution. AA reduced the acetylcholine (ACh)-induced nicotinic currents (nI_{ACh}) evoked by brief applications of ACh to the cells. The dose-response curve showed the reduction of maximum response of nI_{ACh} without causing an appreciable change in the apparent dissociation constant. Indomethacin and nordihydroguaiaretic acid, blockers of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways respectively, did not prevent the action of AA. These results suggest that AA directly acts on the allosteric site of the nicotinic receptor-channel complex and inhibits the ion permeation through the nicotinic receptor-channels.

Key words: Arachidonic acid (アラキドン酸), Nicotinic receptor (ニコチン受容体), Synaptic transmission (シナプス伝達), Sympathetic ganglion cell (交感神経節細胞)

はじめに

アラキドン酸は細胞膜や小胞体膜に存在する不飽和脂肪酸で、動物体内では合成されないため食物から摂取される必須脂肪酸である。アラキドン酸がホスホリパーゼA₂の活性化により細胞膜から遊離すると、シクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼなどの酵素の作用を受けてアラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝過程が進行する。その結果、種々のプロスタグランジン類やロイコトリエン類が産生され^{1, 2)}、生体に発熱や炎症など様々な現象を誘起する。またアラキドン酸は膵臓の細胞内からカルシウムイオンを遊離させたり³⁾、大脳の海馬において学習や記憶に関係したシナプス伝達の長期促進現象に深く関与する可能性がある⁴⁾。さらに中枢培養細胞の細胞膜に

あるナトリウムチャンネルや平滑筋細胞のカルシウムチャンネルまた中枢の抑制性伝達物質であるガンマアミノ酪酸により活性化される塩素イオンチャンネルの透過性を抑制する^{5, 6, 7)}。一方、心筋細胞にあるカリウムチャンネルや中枢神経細胞の興奮性物質であるN-methyl-D-aspartate (NMDA)により活性化されるNMDAチャンネルを流れる電流を促進する^{8, 9)}。副交感神経節細胞ではアセチルコリンにより生じるニコチン受容体を介したシナプス電位がアラキドン酸による修飾を受けて抑制される¹⁰⁾。このようにアラキドン酸の多様な作用が様々な標本を用いて明らかにされてきたが、交感神経節細胞でのアラキドン酸の作用についてはまだよく分かっていない。

本研究の目的は、ウシガエルの交感神経節細胞に存在するコリン作動性シナプス伝達、とくにニコチン受

容体¹¹⁾を介したシナプス伝達に対するアラキドン酸の作用を明らかにすることにある。

方 法

ウシガエル(*Rana catesbeiana*)の交感神経鎖を速やかに取り出し、9番ないし10番目の神経節を標本台に固定した後結合組織を先端が尖ったピンセットで取り除き細胞表面をきれいにする。これによりトリプシンやコラゲナーゼなどの酵素処理を施さなくても単一の交感神経節細胞に微小ガラス電極を刺入することが可能となる。細胞内外の電位差や細胞膜を流れる電流を測定するための微小ガラス電極には3M KClを満たし、その抵抗が30~60 MΩを示す電極を使用した。

細胞に生じる電位変化を電流変化として検出するために、単電極膜電位固定用増幅器(日本光電, CEZ-3100)を使用して膜電位固定を行った。実験で得られる膜電位や膜電流の変化はペンレコーダ(日本光電, RJG-4024)やFMテープ(ソニー, NFR3515W)に連続記録し実験後に解析を行った。

実験に使用した溶液の組成と濃度(mM)は次の通りである。リンゲル液は115.5 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂ および2.4 NaHCO₃を含み、pHは7.4である。シナプス電位やシナプス電流を記録するときには、標本をリンゲル液の代わりに低カルシウム溶液で灌流した。この低カルシウム溶液は無カルシウム溶液とリンゲル液を混合して作成した。無カルシウム溶液はリンゲル液からCaCl₂を除去し、その代わりに12mM MgCl₂を加えNaClで浸透圧を調整して作成した。交感神経節細胞にはニコチン受容体の他にムスカリン受容体が存在しアセチルコリンを与えるとこの受容体を介したムスカリン応答が生じる^{12, 13)}。このためムスカリン応答が実験の妨げとなるとときにはムスカリン受容体の阻害薬であるアトロピン(0.1 μM)を加えた。

アセチルコリンを電気泳動によって標的細胞に投与するために用いるアセチルコリン電極には2 Mのアセチルコリンが詰められている。実験には35~50MΩの電気抵抗を持つ電極を用いた。この電極を標的細胞から50 μmの範囲内にあるように置き、電極の先端からアセチルコリンが漏れ出ないように10~20nAの負の電流を持続して与えた。アセチルコリンは500ミリ秒間の正電流を与えることにより投与した。速い興奮性シナプス後電位(fast excitatory postsynaptic potential,

fast EPSP)やその膜電位固定により得られる興奮性後シナプス電流(fast excitatory postsynaptic current, fast EPSC)は低カルシウム溶液中で節前神経線維の7番目の神経節より中枢側を吸引電極により刺激することで発生させた。

使用した薬物は、アラキドン酸(Sigma)、塩化アセチルコリン(Wako)、インドメタシン(Sigma)、nordihydroguaiaretic acid (NDGA; Sigma)と硫酸アトロピン(Tokyo Kasei)である。アラキドン酸は窒素ガスのなかでdimethyl sulfoxide (DMSO; Wako)に溶解してストック液として-20℃で保存した。これを使用時に解凍し必要な濃度に調整して使用した。なお灌流液中のDMSOの濃度は0.1%以下であり、この濃度のDMSOはシナプス電位に対して何の作用も持たない¹⁴⁾。

結 果

1. アラキドン酸とニコチン性シナプス伝達

ウシガエルの交感神経節細胞に発生する早いシナプス電位(fast EPSP)はコリン性受容体の中のニコチン受容体を介して生じる^{11, 13)}。図1にfast EPSPと-60 mVで膜電位固定して得られたfast EPSCに対するアラキドン酸の作用を示す。fast EPSPやfast EPSCは低カルシウム溶液中で5秒毎に節前神経線維を刺激して発生させた。図1のAにfast EPSPの連続記録を、図1のBには膜電位固定を行ったとき得られるfast EPSCの変化を示す。膜電位固定を行っている間は電位に変化は見られず平坦な直線となっている(図1A)。このことは膜電位固定が十分に成功していることを示している。fast EPSCを連続記録している途中で40 μMのアラキドン酸を灌流液に加えると外向き電流が流れ、fast EPSCの振幅が減少していく。膜電位固定を解除すると、fast EPSPの振幅も抑制されていることが分かる(図1中のb)。fast EPSPやfast EPSCの振幅は神経刺激を与えるたびに異なるため、これらの応答を16回または32回加算平均して得たシナプス応答(図1中のa, b, c, d, e)を連続記録の側に示した。fast EPSPとfast EPSCのアラキドン酸による抑制率は10例の平均でそれぞれ43±7%と42±6%であった。アラキドン酸の抑制作用は可逆的でアラキドン酸を除去するとシナプス応答の振幅も回復した。

図1に示すようにアラキドン酸により外向き電流が

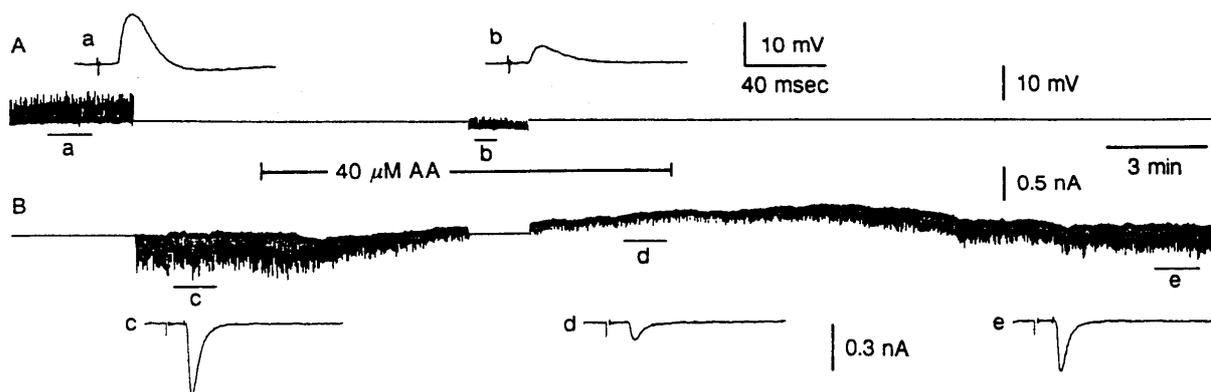


図1 fast EPSPとfast EPSCのアラキドン酸による抑制。

A; fast EPSPの連続記録と連続記録のそばに下線で示した範囲で発生したfast EPSPを32回(a)および16回(b)加算平均して得たfast EPSPの全経過を示す。B; fast EPSCの連続記録と下線部で発生したfast EPSC(c, d, e)を32回加算平均して得たfast EPSCの全経過を示している。fast EPSPとfast EPSCは節前神経繊維を低カルシウム溶液中で5秒ごとに刺激して発生させた。

流れた細胞は10例中6例であった。その大きさはアラキドン酸投与後15分で 0.09 ± 0.06 nA (mean \pm SD)である。外向き電流が流れた細胞では膜電位固定を解除すると細胞は過分極することが認められた。

2. 非競合阻害

ニコチン受容体 α -チャンネルを節前神経線維を刺激することなく活性化させるためには、伝達物質であるアセチルコリンを細胞外に人工的に投与すればよい。リング液にアトロピン($0.1 \mu\text{M}$)を加えてムスカリン受容体を阻害した条件下で、標的細胞にアセチルコリンを電気泳動で0.5秒間与えて得られたニコチン性アセチルコリン電流(nI_{ACh})を図2に示す。図2Aにアラキドン酸の nI_{ACh} に対する抑制作用の連続記録を、図2BにはAの記録の中で*印で示した部分でアセチルコリン電極に異なる刺激を与えたときに生じた nI_{ACh} を示した。アラキドン酸($20 \mu\text{M}$)を投与すると外向き電流が流れ、 nI_{ACh} の振幅が著明に抑制されている。アラキドン酸による nI_{ACh} の平均抑制率は膜電位が -60mV で $85 \pm 10\%$ ($n=5$)であった。図3にはアセチルコリン電極に与えた刺激電流の大きさとそのとき発生した nI_{ACh} の振幅との関係をグラフにとり、アラキドン酸の存在下でこの濃度-反応曲線がどのように変化するかを示した。図3のAで分かるようにアセチルコリン電極に与えた刺激量の範囲では nI_{ACh} の最大応答が得られない。このためアラキドン酸が最大反応を抑制しているのか反応の解離定数を抑制したのかは不明である。そこで、ヒル係数を2.0と仮定してラインウエバー・バーク・プロットを行い作図すると図3Bに示すよう

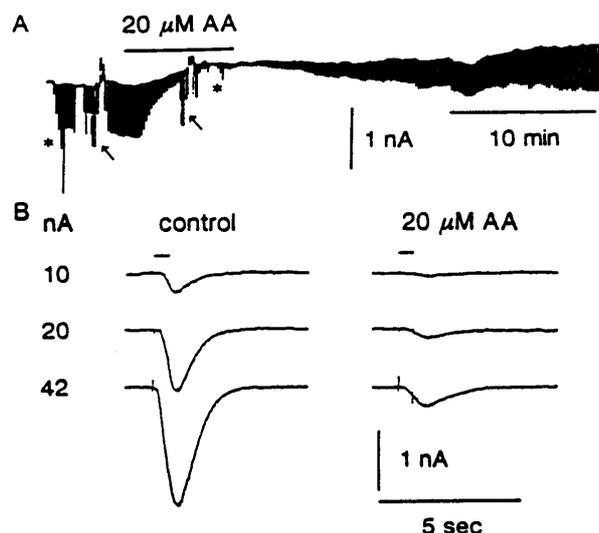


図2 アラキドン酸($20 \mu\text{M}$)による nI_{ACh} の抑制。

A; 20 nAの正の電流により発生した nI_{ACh} に対するアラキドン酸の作用を連続して示した。*印の所でアセチルコリン電極に与える電流量を変化させた。矢印の部分では膜のコンダクタンスを測定するために生じた電流変化を示している。B; *印で示した部分の nI_{ACh} を示す。左の数値はアセチルコリン電極に0.5秒間(記録の側の横棒)流した電流量を示す。

な直線関係を持つグラフが得られた。この直線と縦軸との交点は最大反応の逆数を示し、横軸との交点は見掛けの解離定数の逆数を示している。アラキドン酸は明らかに最大反応を減少させているが見掛けの解離定数には作用していない。見掛けの解離定数の値は細胞周辺の正確なアセチルコリン濃度が不明であるため求めることは出来ない。

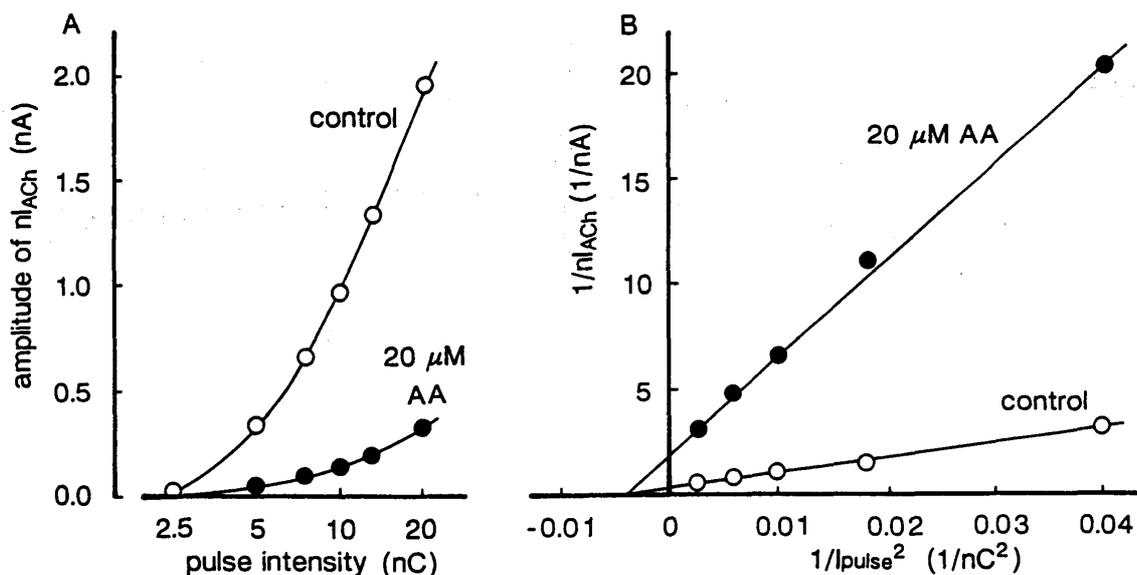


図3 濃度-反応曲線とアラキドン酸の作用。

A; アセチルコリン電極に与えた電流量を横軸の対数にとり、 nI_{ACh} の振幅を縦軸にプロットした。B; Aの記録をライソウエバー・バーク・プロットに変換して示した。ヒル係数を2として取り扱うと図のように直線関係が得られる。

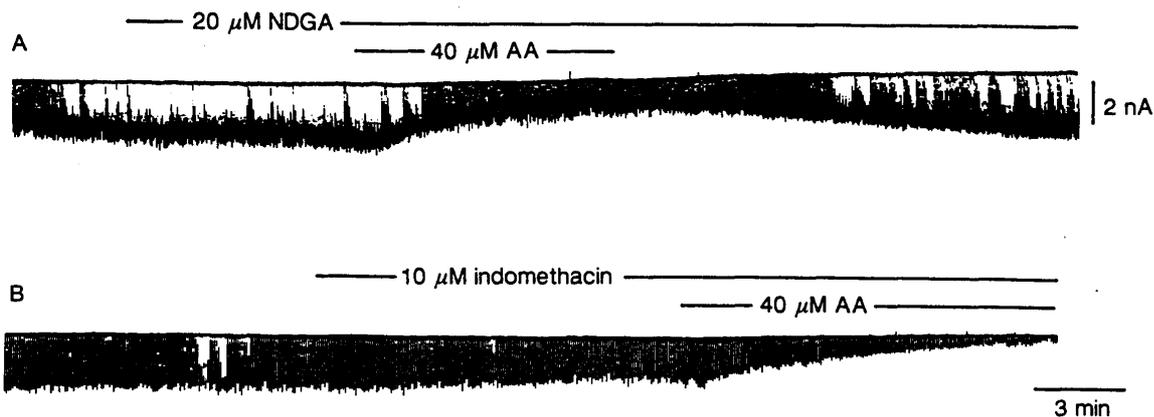


図4 アラキドン酸のfast EPSC抑制作用に対するアラキドン酸カスケード阻害剤の効果。

A; NDGA(リポキシゲナーゼ阻害剤)はアラキドン酸のfast EPSC抑制作用を阻害しない。B; インドメタシン(シクロオキシゲナーゼ阻害剤)はアラキドン酸の抑制作用を阻害しない。fast EPSCは節前神経線維を3秒(A)および4秒(B)毎に刺激して発生させた。

3. アラキドン酸カスケード阻害剤

低カルシウム溶液中で節前神経を連続刺激して得られたfast EPSCに対するアラキドン酸カスケード阻害剤の作用を図4に示す。リポキシゲナーゼ阻害剤であるNDGA ($20 \mu M$)を投与するとfast EPSCの振幅は僅かに増大した。NDGA投与下でアラキドン酸 $40 \mu M$ を与えるとfast EPSCの振幅は著明に減少し(図4A), アラキドン酸の灌流開始後10分で測定した抑制率は $40 \pm 7\%$ ($n=3$)であった。アラキドン酸による抑制作用は一過性であり、灌流液からアラキドン酸を除去する

とfast EPSCはコントロールの大きさに回復する。シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシン $2 \mu M$ を投与するとfast EPSCの振幅は少し減少する。インドメタシン存在下でアラキドン酸 $40 \mu M$ を与えるとfast EPSCは急速に抑制され(図4B), アラキドン酸投与10分後でfast EPSCの振幅は $39 \pm 10\%$ ($n=3$)に減少した。図4Bではアラキドン酸を除去した後の経過を示していないが、アラキドン酸除去後20分ではfast EPSCの回復は見られなかった。

考 察

本研究はウシガエル交感神経節細胞のコリン性シナプス伝達のうちニコチン受容体を介するシナプス伝達に対するアラキドン酸の作用を調べ、アラキドン酸がこのシナプス伝達を抑制することを明らかにした。

アラキドン酸は低カルシウム溶液中で節前神経線維を刺激して発生させたfast EPSCの振幅を約50%抑制した(図1)。一方、リンゲル液中でアセチルコリンを電気泳動により投与して発生させた nI_{ACh} に対してはコントロールの約15%になるまで強く抑制した(図2, 3)。アラキドン酸が nI_{ACh} を抑制したことから、アラキドン酸は交感神経節細胞のニコチン受容体-チャンネルを阻害してシナプス伝達を抑制すると考えられる。ラインウエバー・パーク・プロット(図3B)によればアラキドン酸は nI_{ACh} の最大反応を抑制し、見掛けの解離定数は変えていない。このことはアラキドン酸がニコチン受容体-チャンネルの中の受容体に対するアセチルコリンの結合能には影響を与えることなく、それ以外のアロステリック・サイト例えば受容体-チャンネルのチャンネルに直接結合してチャンネルの開口を阻害していることを示している。その結果、このチャンネルを通過するナトリウムイオンやカリウムイオンの透過性が悪くなりシナプス電流の減少が生じてシナプス伝達が阻害されると思われる。一方、不飽和脂肪酸であるアラキドン酸が膜に溶解込みニコチン受容体を取り巻く環境をかき乱すことによって間接的に受容体-チャンネルの性質を変えてしまうという可能性がある。アラキドン酸が受容体-チャンネルに直接作用するのかあるいは間接的に作用するのかについて結論づけるデータは現在得られていない。EhrengruberとZahler(1991)は牛のクロマフィン細胞へのカルシウムイオンの流入やその細胞からのカテコールアミンの分泌がアラキドン酸で抑制されることを示し、これらはニコチン受容体-チャンネルが直接阻害されるために生じるのであろうと報告している¹⁵⁾。またVijayaraghavan et al.(1995)は雛の毛様体神経節細胞にニコチンを与えたとき生じる応答がアラキドン酸で抑制されると報告している¹⁶⁾。これらの報告は電気生理学的手法によって得られた本研究の結果と矛盾していない。

アラキドン酸による nI_{ACh} の抑制はfast EPSCに対する抑制よりも強く現れる。この違いは次の仮説により説明可能である。交感神経節細胞のニコチン受容体

は、シナプス領域に局限して存在する受容体とそれ以外の領域に分布する受容体がある。シナプス領域とそれ以外のニコチン受容体は異なるサブタイプからなりAChに対する感受性がそれぞれ異なる。fast EPSCはシナプスに局限して存在する受容体を介して発生し、一方 nI_{ACh} は主にシナプス外の受容体を介して発生する。アラキドン酸はシナプス領域よりシナプス外に存在する受容体-チャンネルをより強く抑制する、とするものである。異なるニコチン受容体が同一細胞に存在することは毛様体神経節細胞で報告されている。それによればシナプス領域の受容体はモノクローナル抗体(mAb)35と結合し、 $\alpha 3$, $\beta 4$, $\alpha 5$ サブユニットを含んでいる^{16, 17)}。シナプス領域以外の受容体はヘビ毒の α ブングロトキシンに高い結合能を保持し、 $\alpha 7$ サブユニットを含んでいる^{17, 18, 19)}。またシナプス領域以外に存在するニコチン受容体を介した応答がアラキドン酸により可逆的に強く抑制されることも報告されている¹⁰⁾。この結果は本研究の仮説を支持するものである。

アラキドン酸カスケードの阻害剤であるインドメタシンもNDGAもアラキドン酸によるニコチン性シナプス伝達の抑制作用を阻害しなかった(図4)。このことはアラキドン酸の代謝産物であるプロスタグランジン類やロイコトリエン類を介することなく、アラキドン酸自身がニコチン受容体-チャンネルの活性化を直接抑制していることを示す。毛様体神経節細胞では脂肪酸のうち二重結合を2個(linoleic acid)また3個(linolenic acid)持つ不飽和脂肪酸がアラキドン酸と同様にニコチン性応答を抑制すること、その抑制作用はアラキドン酸より弱いことが報告されている¹⁰⁾。またクロマフィン細胞ではアセチルコリンによるカテコールアミンの遊離作用がリポキシゲナーゼを介する代謝経路を阻害するインドメタシンで影響されないとの報告がある¹⁵⁾。これらの結果はアラキドン酸が直接作用してニコチン性シナプス応答を抑制したという本研究の結論と一致している。

本研究では、アラキドン酸がニコチン受容体-チャンネルを抑制する作用機序について焦点を絞って述べてきた。しかし節前神経の興奮性や神経終末からのアセチルコリンの遊離機構に対してアラキドン酸がどのように作用するかについては全く触れなかった。この点については、節前神経線維の活動電位やシナプス遅延がアラキドン酸によって変化しないこと、また伝達物質の放出機構に深く関係したシナプス伝達の短期促進や

長期促進といった現象に対してもアラキドン酸は何の作用もないことを確認している。

ま と め

ウシガエルの交感神経節におけるニコチン性シナプス伝達に対するアラキドン酸の作用を調べた。アラキドン酸は低カルシウム溶液中で節前神経繊維を刺激して発生させた興奮性後シナプス電位や電流を可逆的に抑制した。またアセチルコリンを電気泳動で投与し発生させたアセチルコリン電流(nI_{ACh})も抑制した。濃度-反応曲線を分析した結果、アラキドン酸は見掛けの解離定数を変えずに nI_{ACh} の最大反応を抑制していることが明らかとなった。アラキドン酸カスケードの阻害剤はアラキドン酸の抑制作用を除去することができなかった。以上の結果から、アラキドン酸はニコチン受容体-チャンネルのアロステリックサイトに直接作用してこのチャンネルのイオン透過を減少し、ニコチン性シナプス伝達の抑制を起こすと考えられる。

参考文献

- 1) Axelrod, J.: Receptor-mediated activation of phospholipase A_2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.*, 18: 503-507 (1990).
- 2) Piomelli, D. and Greengard, P.: Lipoygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signaling. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 367-373 (1990).
- 3) Maruyama, Y.: Control of inositol polyphosphate-mediated calcium mobilization by arachidonic acid in pancreatic acinar cells of rats. *J. Physiol.(Lond.)*, 463: 729-746 (1993).
- 4) Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A. et al.: Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*, 341: 739-742 (1989).
- 5) Fraser, D.D., Hoehn, K., Weiss, S. et al.: Arachidonic acid inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons. *Neuron*, 11: 633-644 (1993).
- 6) Shimada, T. and Somylyo, A.P.: Modulation of voltage-dependent Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 100: 27-44 (1992).
- 7) Schwartz, R.D. and Yu, X.: Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res.*, 585: 405-410 (1992).
- 8) Kim, D. and Clapham, D.E.: Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science*, 244: 1174-1176 (1989).
- 9) Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S. et al.: Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature*, 355: 722-725 (1992).
- 10) Vijayaraghavan, S., Huang, B., Blumenthal, E.M. et al.: Arachidonic acid as a possible negative feedback inhibitor of nicotinic acetylcholine receptors on neurons. *J. Neurosci.*, 15: 3679-3687 (1995).
- 11) 簗田昇一, 熊本栄一, 久場健司: イオンチャンネルの種類: アセチルコリンレセプターチャンネル. *Clinical Neuroscience*, 10(4): 56-60 (1992).
- 12) Minota, S.: Delayed onset and slow time course of the non-M-type muscarinic current in bullfrog sympathetic neurons. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.*, 429: 570-577 (1995).
- 13) 簗田昇一: シナプスの機能: 速い情報伝達と遅い情報伝達. *Clinical Neuroscience*, 14(8): 74-77 (1996).
- 14) Minota, S., Kumamoto, E., Kitakoga, O., et al.: Long-term potentiation induced by a sustained rise in the intraterminal Ca^{2+} in bullfrog sympathetic ganglia. *J. Physiol.(Lond.)*, 435: 421-438 (1991).
- 15) Ehrenguber, M.U. and Zahler, P.: Inhibition of the nicotinic ion channel by arachidonic acid and other unsaturated fatty acids in chromaffin cells from bovine adrenal medulla. *Chimia*, 45: 45-49 (1991).
- 16) Sargent, P.B.: The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16: 403-443 (1993).
- 17) Vernallis, A.B., Conroy, W.G. and Berg, D.K.:

- Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits while maintaining subunit segregation among receptor subtypes. *Neuron*, 10: 451-464 (1993).
- 18) Dun, N.J. and Karczmar, A.G.: Blockade of ACh potentials by alpha-bungarotoxin in rat superior cervical ganglion cells. *Brain Res.*, 196: 536-540 (1980).
- 19) Zhang, Z.-W., Coggan, J.S. and Berg, D.K.: Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to α -bungarotoxin. *Neuron*, 17: 1231-1240 (1996).

(受付: 1997年12月15日; 受理: 1998年 2月 3日)