

[原著]

ドーパミン神経細胞に入力するグルタミン酸作動性神経終末部上のコリン作動性ニコチン様受容体 (nAChR) の機能的役割

野 中 喜 久

Functional role of nicotinic Ach receptors (nAChRs) on presynaptic glutamatergic nerve endings projecting to dopamine neuron.

Kiku NONAKA

抄録

1. ラット脳黒質ドーパミン (DA) ニューロンのシナプス・ブートン標本を用いてグルタミン酸 (Glu) 作動性神経終末部から自発的に放出される Glu 惹起の興奮性シナプス後電流 (sEPSC) を記録した。sEPSC の発生頻度, 電流振幅および電流キネティクスを指標に, DA ニューロンへのニコチンの直接, 間接的作用を検討した。
2. ニコチンは DA ニューロンに入力する Glu 作動性神経終末部から放出される Glu によって惹起される sEPSC の発生頻度と電流振幅の増加や DA ニューロン細胞体に興奮性内向き電流を発生した。したがって ACh 作動性ニコチン様受容体 (nAChR) の分布は先行研究で明らかとなった DA 神経終末部のみならず Glu 作動性神経終末部と DA ニューロン細胞体上にも存在することが今回明らかとなった。
3. ニコチンは sEPSC の活性, 不活性の電流キネティクスを変化させず, またシナプス内 Glu 受容体にも作用しなかった。よってニコチン存在下の sEPSC 電流振幅の増加は Glu 作動性神経終末からの Glu 放出量の増加に依存する。

キーワード: DA ニューロン, Glu 作動性神経終末部, 自発性の興奮性シナプス後電流 (sEPSC), ACh 作動性ニコチン様受容体 (nAChRs) の存在部位, シナプス・ブートン標本

I. 緒言

ドーパミン (DA) ニューロンの神経終末は線条体と側坐核, 前頭皮質に投射して運動機能, 報酬, 認知機能に関与するが, この DA ニューロン自体は周囲のグルタミン酸 (Glu), GABA, 線条体のアセチルコリン (ACh) 作動性インターニューロンからの入力を受ける¹⁾。これまでの生体内 (in vivo) や脳切片 (slice) 標本を用いた研究では, DA 作動性神経終末上に ACh 作動性のニコチン様受容体 (nAChR) の存在が知られている²⁾。また DA 作動性神経終末上に存在する Glu 受容体 (GluR)

のサブタイプである AMPA 受容体は nAChR と共存して DA 放出の制御にも関わる³⁻⁶⁾。一方, nAChR アゴニストであるニコチンは DA 作動性神経終末部への nAChR を介する効果のほか機序不明な作用を有することや, スライス標本上で興奮性の自発性シナプス後電流 (sEPSC) を促進するが, 抑制性のシナプス後電流 (sIPSC) には無効との報告もある⁷⁾。

本研究の目的は, 生体内や脳切片標本使用時にみられる DA ニューロンへの他ニューロンやグリア (アストロサイト) などからの直接, 間接的な神経性ならびに液性化学物質の影響を受けない機械的に

単離した単一 DA ニューロンの‘シナプス・ブートン標本’^{8,9)}を用い、DA ニューロンに入力する興奮性 Glu 作動性神経終末からの Glu 放出が、その神経終末上に存在すると予想される nAChR の作用によっていかに修飾されるかを電気生理学的手法を用いて解明することである。すなわちシナプス前 Glu 作動性神経終末部のシナプス後膜側にあたる DA ニューロン細胞体から自発性 sEPSC をホールセルパッチクランプ法によって記録し、sEPSC の発生頻度と電流振幅、キネティクスを指標にして nAChR を介するニコチン作用を検討するとともに、nAChR が DA ニューロン細胞体上にも存在し、ニコチンがどのような作用を発現するか否かについても検討した。

II. 方法

本研究に使用したラットは熊本保健科学大学動物実験委員会の承認（動18-02）を受けて実験に使用した。生後10～18日齢の Wistar 系ラットに三種混合麻酔を腹腔内投与（0.1ml/g）して深麻酔後、脳を摘出した。その後、摘出脳を95% O₂-5% CO₂ ガスで飽和した氷冷の浸漬外液（インキュベーション溶液）に移し、マイクロスライサー（Leica VT1200）を用いて厚さ380 μm の脳切片（スライス）標本作製した。インキュベーション液の組成（mM）は、NaCl 124, KCl 5, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.4, NaHCO₃ 24, MgSO₄ 1.3とグルコース 10で、95% O₂-5% CO₂ ガスを飽和させ pH7.4に調整した。スライス標本は神経機能を回復させるため22～24℃の本液中に1時間放置した。その後、実体顕微鏡下で先端を丸くした微小なガラスピペットの先端をスライス標本の黒質領域に接触させ、機械的振動（40～50Hz）を与えて DA ニューロンを単離した。これらのニューロンには興奮性の Glu や抑制性の GABA 作動性神経終末部が正常な生理機能を維持したまま多数付着している（シナプス・ブートン標本）。

本単離 DA ニューロンにホールセルパッチ記録法を適用し、電気生理学実験を遂行した。つまり細胞外液（標準外液）灌流下、シャーレ内単離 DA ニューロンにガラスパッチ電極を密着させ、瞬時に強い陰圧を加え細胞内と電極内を交通させ、DA ニューロン細胞膜を横切るイオン電流を記録する。

標準外液組成（mM）は、NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, グルコース 10と HEPES 10で、ガラスパッチ電極内液組成（mM）は CsCl 5, CsF 135, CsF 5, TEA-Cl 2, EGTA 2と HEPES 10で、それぞれ Tris-base により pH を 7.4 に調整して使用した。

今回の電気生理学的膜電位固定実験では、保持電位を GABA の Cl⁻ 平衡電位（-60mV）に固定し、0mV に平衡電位を有する興奮性自発性 Glu 作動性のシナプス後電流（spontaneous excitatory postsynaptic current : sEPSC）のみを選択的に記録した。ニコチン（10⁻⁵M～3×10⁻⁵M）は標準外液に添加し、瞬時に外液を交換する Y チューブ法¹⁰⁾を採用した。受容体-イオンチャネル型の ACh 作動性ニコチン様受容体（nAChR）をその選択的アゴニストであるニコチンで刺激し、DA ニューロンに入力するシナプス前 Glu 作動性神経終末部やシナプス後 DA ニューロン細胞体上に nAChR が存在するかを調べた。なお両部位へのニコチン作用の区別は、もし sEPSC の発生頻度が変化すればシナプス前 Glu 作動性神経終末部に nAChR が存在し、また DA ニューロン細胞体自体に興奮性内向き電流が発生すれば DA ニューロン細胞体にも nAChR が存在すると判定した。さらに sEPSC キネティクス（シナプス電流の発生頻度、電流振幅、活性化・不活性化の時定数）変化の有無からシナプス前 Glu 神経終末からの Glu 放出量に変化している否かの指標とした。得られたデータは、*t* 検定により *p*<0.05 を有意差ありとした。

III. 結果

図 1 は DA ニューロンに興奮性 Glu ならびに抑制性 GABA 作動性神経終末部が直接に、さらに自律神経系の ACh 作動性神経終末部（DA ニューロンから離れたところに存在する数珠状に連なる自律神経系特有のバリコシティと呼ばれる神経終末部）が間接的に入力し、それぞれから放出される Glu, GABA と ACh の作用を受けていることを示している。

先行研究によると DA 作動性神経終末上に nAChR の存在が指摘されている²⁾が、本実験では DA ニューロンに入力する Glu 作動性神経終末部やそのシナプス後膜部の DA ニューロン細胞体上に nAChR が存在するかについて検討した。図 2 A は

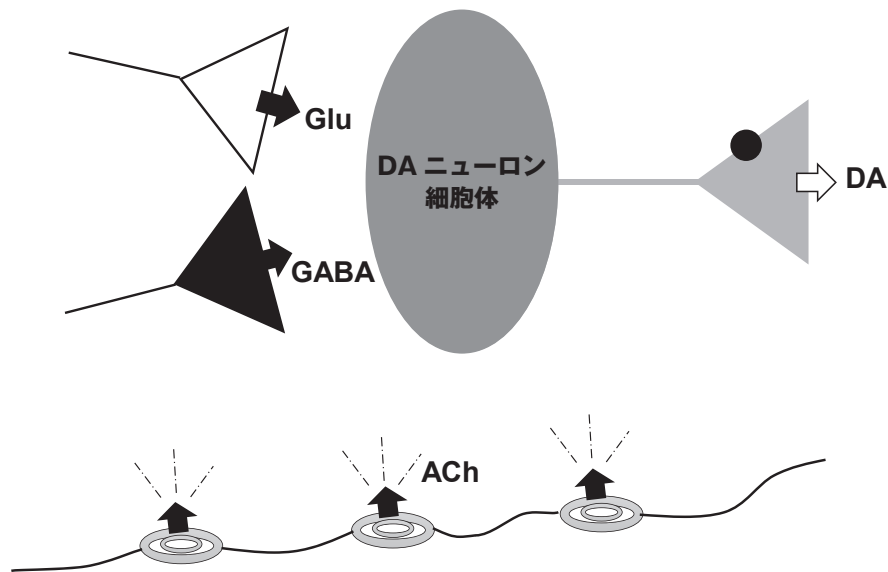


図 1

ドーパミン (DA) ニューロンに直接入力する興奮性グルタミン酸 (Glu) 作動性神経終末と抑制性 GABA 作動性神経終末からそれぞれ放出される Glu と GABA。自律神経系のアセチルコリン (ACh) 作動性終末から放出、拡散される ACh は Glu 神経終末部や DA ニューロンの細胞体とその神経終末部を間接的に修飾する。先行研究で証明された DA 作動性神経終末部に存在する ACh のニコチン様受容体 (nAChR, 黒丸) の活性化は DA 遊離を促進。

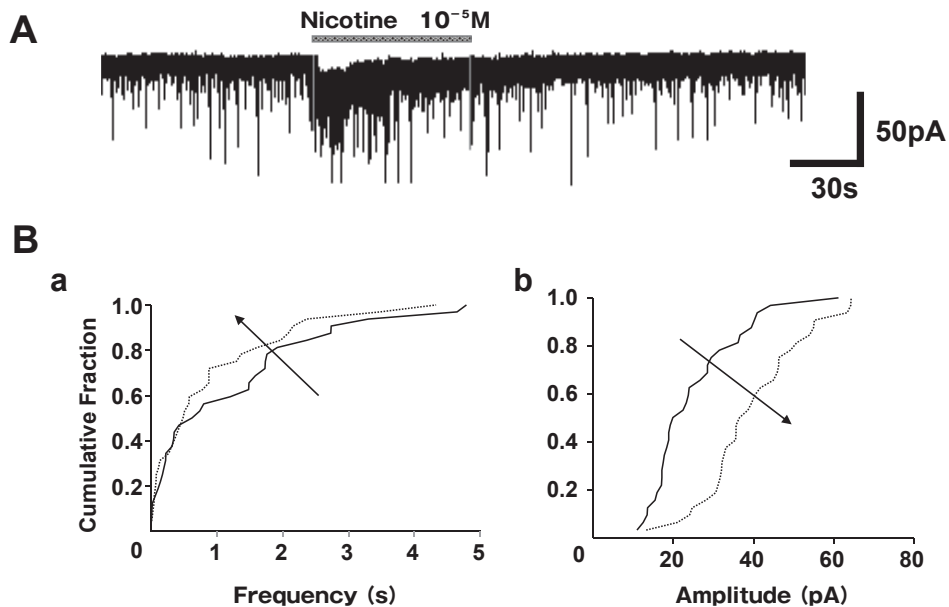


図 2

- A. Glu 作動性神経終末部から自発的に遊離された Glu で惹起される自発性の興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current : sEPSC) へのニコチン (Nicotine, 10^{-5}M) 効果。sEPSC は DA ニューロン細胞体からホールセルパッチクランプ法によって記録した。
- B. ニコチン作用前後の sEPSC の発生頻度 (Frequency, a) と電流振幅 (Amplitude, b) の累積分析グラフ。各々の図のコントロールは実線、ニコチン存在下は点線。a と b の矢印はニコチンによるコントロールカーブからの移行方向を示す

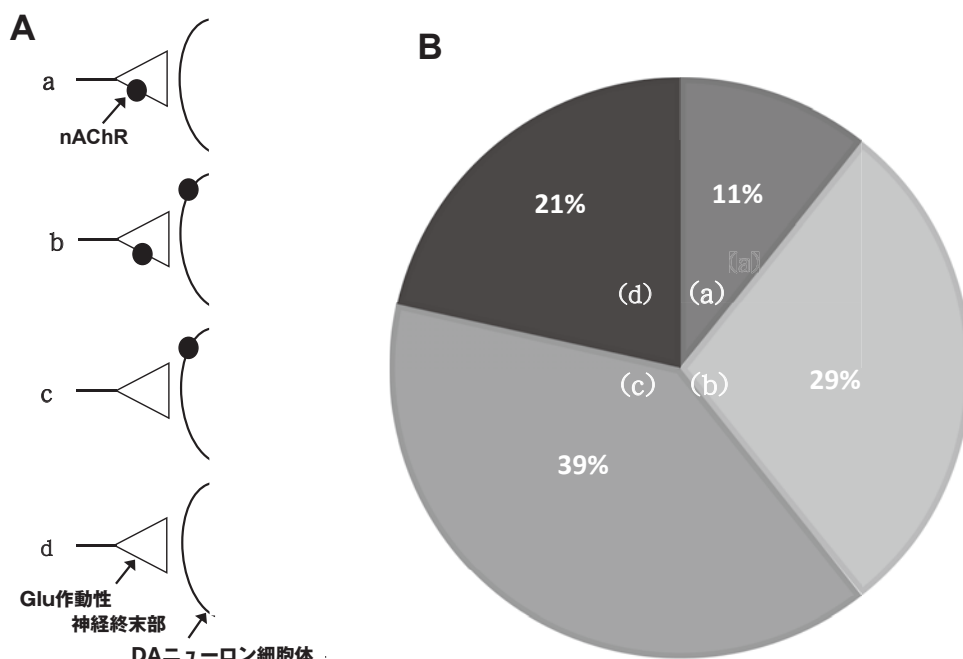


図 3

- A. Glu 作動性神経終末部と DA ニューロン細胞体に存在する ACh 作動性ニコチン様受容体 (nAChR) を黒丸で示す模式図。
 B. nAChR が Glu 作動性神経終末部や DA ニューロン細胞体にどのような割合で存在するかを示す円グラフ。データは28個の DA ニューロンから得た。

ニコチン作用前後の sEPSC の典型例を示す。本記録にみられる小さなスパイク状の内向き電流は DA ニューロンに付着した多くの Glu 作動性神経終末部から放出された Glu で発生した sEPSC である。ニコチンを作用させると sEPSC の頻度の増加、電流振幅の増大に加えて緩徐な内向き電流が DA ニューロン細胞体で発生した。すなわち nAChR がシナプス前の Glu 作動性神経終末だけでなく、シナプス後膜側の DA ニューロン細胞体にも存在することを示唆している。図 2 B は A の sEPSC 記録電流の発生頻度 (a) と電流振幅 (b) を累積分析した結果で、a と b のカーブがニコチン存在下において左と右へと移行することを矢印で示した。すなわちニコチンによって sEPSC の発生頻度の増加と電流振幅の増大が生じたことを統計学的に示すものである。

使用した28個の DA ニューロンのシナプス・ブートン標本において、nAChR がシナプス前 Glu 作動性神経終末部やシナプス後膜側の DA ニューロン細胞体にいかに分布するかを sEPSC の発生頻度の増加と DA ニューロン細胞体の内向き電流発生の有無を指標に検討した。sEPSC の (a) 発生頻度のみ増加 3 個、(b) 発生頻度の増加と内向き電流

の発生 8 個、(c) 内向き電流のみ発生 11 個、(d) 効果なし 6 個であった。図 3 A の模式図は本実験結果に基づいて Glu 作動性神経終末部や DA ニューロン細胞体に存在した nAChR を黒丸で示したものである。(a) Glu 作動性神経終末のみ、(b) Glu 作動性神経終末と DA ニューロン細胞体、(c) DA ニューロン細胞体のみ、(d) は両者とも存在しないことを示す。また、上記結果からそれらの分布状態を円グラフにまとめたのが図 3 B である。その結果、nAChR は DA ニューロン細胞体の 68% に、Glu 作動性神経終末部の 40% にそれぞれ存在した。

図 4 A はニコチンを作用させる前後での sEPSC 電流のキネティクスを、電流の活性化 (time to peak) と不活性化 (1/e decay time) で検討したものである。コントロールでの time to peak は 0.68 ± 0.05 ms, 1/e decay time (τ decay) は 1.45 ± 0.07 ms で、ニコチン投与後の time to peak は 0.86 ± 0.1 ms, τ decay は 1.71 ± 0.11 ms で、ニコチンの有無による値間の有意差は両成分とも $p > 0.05$ で認められなかった。

図 4 B はニコチン投与前後の電流振幅を同じ (superimposed) にして、両者間の電流パターンを

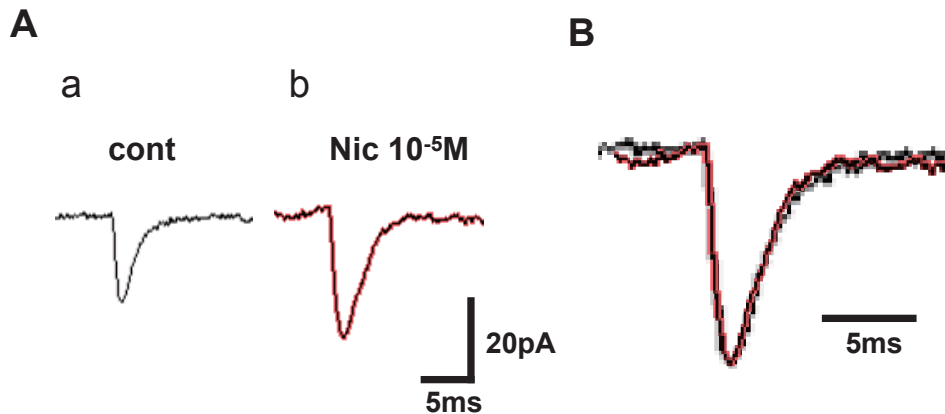


図4 ニコチン有無下で得られる sEPSC の活性化、不活性化のキネティクス

- A. a、b ともに27個の sEPSC を PC で処理して平均化したもの。
 B. a と b の電流振幅を同じ (Normalized) にして重ね合わせた (Superimposed)。電流トレースで黒はコントロール、赤はニコチン存在下。両電流トレース間の電流キネティクスに差は認められない。これはシナプス下膜上のシナプス内 Glu 受容体 (Glu 受容体のサブタイプである AMPA やカイニン酸 (KA) 受容体からなる) にニコチンが何ら影響を与えないことを示唆する。

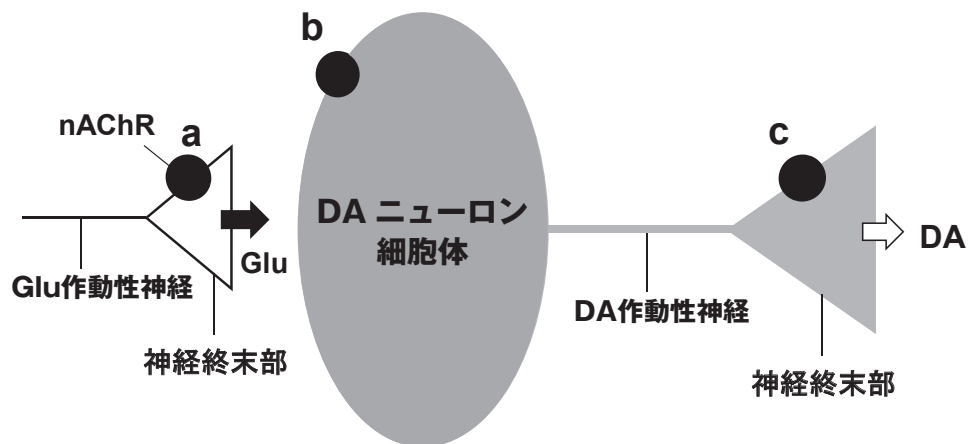


図5 研究成果をまとめた模式図

nAChR は先行研究で得られた DA 作動性神経終末部 (c) のみならず、本研究で Glu 作動性神経終末部 (a) や DA ニューロンの細胞体 (b) にも存在することが明らかになった。

比較したもので、ニコチン投与前 (黒線) と後 (赤線) の電流パターン間に差はなかった。なお、sEPSC の電流の不活性化は単一指数関数的減衰を示した。

本実験と先行研究^{2-7, 11)} の DA ニューロン領域における nAChR 存在部位をまとめたのが図5である。今日まで nAChR は DA 作動性神経終末部 (c) にあると報告されていたが、本実験から DA ニューロンに入力する Glu 作動性神経終末部 (a) や DA ニューロン細胞体 (b) にも存在する新知見が得られた。よって DA 作動性神経終末からの DA 放出は、

DA ニューロンへの入力する Glu 作動性神経終末部、DA ニューロン細胞体、そして DA 作動性神経終末部に存在する各々の nAChR によって促進的修飾を受けることが明らかとなった。

IV. 考察

DA 作動性神経終末からの DA 放出はその神経終末上に存在する ACh のニコチン様受容体 (nAChR) によって修飾されると報告されてきた^{2-7, 11)}。しかし今回の実験から、DA ニューロンに入力する Glu

作動性神経終末上にも nAChR が存在して、その神経終末部からの Glu 放出頻度をニコチンが増加させることが明らかになった。またニコチンは sEPSC の発生頻度増加に加えてその電流振幅も増大したが、ニコチンによって sEPSC のキネティクスが全く変化しなかったことから、ニコチンは Glu 作動性神経部側に直接作用して Glu 放出頻度のみならず Glu 放出量も増加させることが明らかとなった。このニコチンによる sEPSC 発生頻度や電流振幅の増加や DA ニューロン細胞体における興奮性内向き電流の発生機序は、イオンチャネル型 nAChR のニコチン様受容体と共役する large cation channel を通過する Na^+ や Ca^{2+} による細胞内 Ca^{2+} 増加や^{12, 13)}、細胞内に流入した Ca^{2+} による Ca-induced Ca release (CICR) によるさらなる細胞内 Ca^{2+} の増加が Glu 作動性神経終末部や DA ニューロン細胞体や神経終末部の脱分極を惹起した結果と考えられる。nAChR を介する DA 作動性神経終末部からの DA 放出機序でも同様の報告がなされている^{1, 2)}。なお、化学受容体と共役する large cation channel の存在例は ATP 受容体でも知られており、Glu, GABA およびグリシン作動性神経のシナプス前後で ATP もニコチン同様に作用し、興奮性の sEPSC や抑制性の sIPSC 発生頻度の増加や電流振幅を増加したり、シナプス後膜側のニューロン細胞体を脱分極させる^{14, 15)}。

一方で、Marchal ら (1997) によると nAChR の作用には機序不明のニコチン効果の存在が報告されている。本実験では nAChR が Glu 作動性神経終末部だけでなくシナプス後膜側の DA ニューロン細胞体にも存在して内向き電流を発生することが明らかとなった。よって先行研究で不明とされていたニコチンの作用は、DA ニューロン細胞体へのニコチンの直接効果に起因するものではないかと考えられる。以上をまとめると、nAChR は DA ニューロン細胞体やその神経終末部のみならず DA ニューロンに入力して DA ニューロンを活性化する Glu 作動性神経終末にも発現しており、これら全てが DA ニューロンの機能を促進的に修飾し、DA 放出の微細な調節が行われている。

DA ニューロンで測定されたキネティクスの電流活性化中の time to peak と不活性化中の 1/e decay time の値は、これまで報告されたラット海馬ニューロンの値より速く、ラット脊髄ニューロンの値に近

かった¹⁶⁻¹⁸⁾。すなわち DA ニューロンの sEPSC の膜特性キネティクスは下位脳の脊髄ニューロンに近く、すばやい 'on' と 'off' を示した。また、DA ニューロンの sEPSC の電流振幅も小さく、脊髄ニューロンの値とほぼ同じであった。このように同じ上位脳の DA ニューロンと海馬ニューロン間の違いは明らかである。DA ニューロンが海馬ニューロンと異なり、常時自発性の活動電位の変化 (リズム的な burst spike の発生) を行っていること¹⁹⁾と何らかの関係があるのかもしれない。その解明にはさらなる研究が必要である。

他方、これまで DA 細胞からの DA 放出の減少がパーキンソン病、増加が認知症に関与することが注目されてきたが、DA 細胞に入力する Glu 作動性神経終末部からの Glu 放出やバリコシティから広範囲に放出拡散される ACh による DA ニューロンの修飾についての考察はほとんどなされていない。本報告では、① Glu 作動性神経終末部の nAChR が Glu 放出を促進する、② DA 細胞体上の nAChR が細胞自身の興奮性リズムを亢進する、③ DA 神経終末部の nAChR が DA 放出を促進することを初めて示唆した。すなわち DA 放出異常と関連する病態発生について臨床的見地からも nAChR の関与に注目すべきであろう。

謝辞

本研究の遂行にあたり助言を頂いた熊本機能病院 臨床研究推進センター顧問 赤池紀生先生に深謝致します。なお本研究は、熊本保健科学大学学内研究費 (2018-C-09) の助成を受けたものである。

本研究における利益相反は存在しない。

文献

1. J. L. Koranda, J. J. Cone, D. S. McGehee, et al. : Nicotinic receptors regulate the dynamic range of dopamine release in vivo. *J. Neurophysiol.* 111 (1) : 103-111. 2014.
2. D L Marshall, P H Redfern, S Wonnacott : Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: comparison

- of naive and chronic nicotine-treated rats. *J. Neurochem.* 68 (4) : 1511-1519. 1997.
3. M. Grilli, M. Summa, A. Salamone, et al., : In vitro exposure to nicotine induces endocytosis of presynaptic AMPA receptors modulating dopamine release in rat nucleus accumbens nerve terminals. *Neuropharmacology.* 63 (5) : 916-926. 2012.
 4. C Rapiet, G G Lunt, S Wonnacott : Stereoselective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J Neurochem.* 50 (4) : 1123-1130. 1988.
 5. S Grady, M J Marks, S Wonnacott, et al., : Characterization of nicotinic receptor-mediated [³H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem.* 59 (3) : 848-856. 1992.
 6. A I Sacaan, J L Dunlop, G K Lloyd : Pharmacological characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat brain slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 274 (1) : 224-230. 1995.
 7. Licheri, O. Lagström, A. Lotfi, et al., : Complex Control of Striatal Neurotransmission by Nicotinic Acetylcholine Receptors via Excitatory Inputs onto Medium Spiny Neurons. *J Neurosci.* 38 (29) : 6597-6607. 2018.
 8. Akaike N, Moorhouse AJ. : Techniques: applications of the nerve-bouton preparation in neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 24 (1) : 44-47. 2003.
 9. Nonaka K, Kotani N, Akaike H, et al., : Xenon modulates synaptic transmission to rat hippocampal CA3 neurons at both pre- and postsynaptic sites. *J Physiol.* ; 597 (24) : 5915-5933. 2019.
 10. Murase K, Randic M, Shirasaki T, et al., : Serotonin suppresses N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res.* 525 (1) : 84-91. 1990.
 11. H el-Bizri, P B Clarke : Blockade of nicotinic receptor-mediated release of dopamine from striatal synaptosomes by chlorisondamine and other nicotinic antagonists administered in vitro. *Br J Pharmacol.* 111 (2) : 406-413. 1994.
 12. Jang IS, Rhee JS, Kubota H, et al., : Developmental changes in P2X purinoceptors on glycinergic presynaptic nerve terminals projecting to rat substantia gelatinosa neurones. *J Physiol.* 536 (Pt 2) : 505-519. 2001.
 13. H Taschenberger, R Jüttner, R Grantyn : Ca²⁺-permeable P2X receptor channels in cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 19 (9) : 3353-3366. 1999.
 14. Evans RJ, Derkach V, Surprenant A.: ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 357 (6378) : 503-505. 1992.
 15. S Hugel , R Schlichter : Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci.* 20 (6) : 2121-2130. 2000.
 16. Keller BU, Konnerth A, Yaari Y.: Patch clamp analysis of excitatory synaptic currents in granule cells of rat hippocampus. *J Physiol.* 435 : 275-293. 1991.
 17. Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, et al., : Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *J Physiol.* 422 : 203-225. 1990.
 18. Konnerth A, Keller BU, Lev-Tov A.: Patch clamp analysis of excitatory synapses in mammalian spinal cord slices. *Pflügers Arch.* 417 (3) : 285-290. 1990.
 19. Uchida S, Akaike N, Nabekura J.: Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology.* 39 (2) : 191-201. 2000.

(令和3年11月19日受理)

Functional role of nicotinic Ach receptors (nAChRs)
on presynaptic glutamatergic nerve endings
projecting to dopamine neuron.

Kiku NONAKA

Summary

1. Effects of nicotine on “synapse bouton preparations” of dissociated rat substantia nigra pars compacta dopamine (DA) neurons were investigated using the conventional whole-cell patch clamp technique at a holding potential of -60mV .
2. In the majority of the neurons, nicotine increased not only the frequency but also the amplitude of the glutamatergic spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC), although it did not change the glutamatergic current kinetics.
3. Nicotine induced an excitatory slow inward current in DA neurons.
4. The nicotinic excitatory actions on both presynaptic glutamatergic nerve endings and postsynaptic DA cell bodies appeared *via* the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) on the glutamatergic nerve endings and DA cell bodies.
5. It is concluded that DA release from dopaminergic nerve endings is governed by the nAChRs on the glutamatergic nerve endings, DA cell bodies, and dopaminergic nerve endings.