

## Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出における一酸化窒素の機能的意義

肥後 敦子

Ca<sup>2+</sup> ionophore である ionomycin が Ca<sup>2+</sup> 依存性神経伝達物質放出を誘発すること、および NO 生成を誘発すること、さらに NO が神経伝達物質放出を促進させることから、ionomycin 誘発性神経伝達物質放出が NO の生成を介して行われる可能性が考えられる。そこで本研究では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出における NO の機能的役割を、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて検討した。Ionomycin は、神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA 放出を用量依存性に増加させた。この ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は、NO scavenger である hemoglobin および NO 合成酵素阻害薬である N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine および N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine により用量依存性に抑制された。Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送阻害薬である nipecotic acid および NO-711 は用量依存性に ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出を約50%抑制した。また、それぞれ L 型および P/Q 型 voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel (VDCC) 阻害薬である nifedipine および ω-agatoxin VIA の共存下では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は約50%減少し、さらにこの条件下に nipecotic acid あるいは NO-711 を反応系に添加することにより ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は完全に消失した。Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は hydroxyl radical scavenger である dimethylthiourea により用量依存性に増加した。以上の実験成績から、ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は ionomycin による細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入に引き続く NOS 活性化とこれに伴う NO の生成を介して誘発されると考えられる。

(平成12年3月11日受理)

### Significance of Nitric Oxide in Ionomycin-evoked [<sup>3</sup>H] GABA Release from Mouse Cerebral Cortical Neurons

Atsuko HIGO

Functional significance of nitric oxide (NO) in ionomycin-evoked [<sup>3</sup>H] γ-aminobutyric acid (GABA) release was investigated using primary culture of mouse cerebral cortical neurons. Ionomycin increased [<sup>3</sup>H] GABA release in a dose-dependent manner. This stimulatory action of ionomycin on [<sup>3</sup>H] GABA release was dose-dependently inhibited by hemoglobin, a NO scavenger, and a NO synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, suggesting that the ionomycin-evoked [<sup>3</sup>H] GABA release from the neurons is mediated by NO production. Inhibitors for Na<sup>+</sup>-dependent carrier-mediated GABA transport, nipecotic acid and 1-(2-(((diphenylmethylene)amino)oxy)ethyl)-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridine-carboxylic acid (NO-711), reduced the ionomycin-evoked [<sup>3</sup>H] GABA release by about 50%. Similarly, the release was also reduced

by about 50% in the concomitant presence of  $\omega$ -agatoxin VIA, an inhibitor specific for P/Q type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel (VDCC), and nifedipine, an inhibitor for L-type VDCC. Either nipecotic acid or NO-711 completely abolished the ionomycin-evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release in the presence of these two inhibitors for VDCC. In addition, a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, dose-dependently facilitated the ionomycin-evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release. These effects observed in the presence of  $\text{Na}^+$ -dependent carrier-mediated GABA transport inhibitors, inhibitors for VDCC, and dimethylthiourea were similar to NO-induced effects previously reported. These results lead to the conclusion that the ionomycin-evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release is mediated via the formation of NO. (Accepted on March 11, 2000) *Kawasaki Igakkaishi* 26(1): 13-23, 2000

**Key Words** ① Ionomycin ② Nitric oxide ③ GABA release  
④ Cerebral cortical neurons

## 緒 言

Ionomycin は  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore の 1 つであり、神経細胞膜における  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  交換を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘発させる作用を有しており<sup>1)~3)</sup>、この作用を応用して従来より薬理学的研究において  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の神経伝達物質放出を誘発させる手段として利用されてきた。また、最近の研究により、ionomycin が神経伝達物質および血管内皮細胞などに局在する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) の活性化を誘発し、cyclic GMP 生成などの生理的機能の変化をもたらすことが報告されている<sup>4)~9)</sup>。

一方、NO は神経細胞において諸種の神経伝達物質の放出を促進する因子の 1 つとして作用していることが、多くの研究により明らかにされている。すなわち、NO generator である sodium nitroprusside (SNP) や S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) などの諸種の脳組織標品への直接的な適用により、線条体からの dopamine 放出<sup>10)</sup>、大脳皮質神経細胞からの acetylcholine (ACh) および  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) の放出<sup>11)~14)</sup> が、また海馬切片からは ACh および norepinephrine の放出<sup>15)</sup> が、それぞれ増加することが報告されており、これらの実験成績は細胞外に添加した外因性の NO が神

経伝達物質放出促進作用を有することを示すものであると考えられる。これに加え、N-methyl-D-aspartate (NMDA) により視床下部からの norepinephrine の放出<sup>16)</sup>、線条体からの dopamine 放出<sup>17),18)</sup>、大脳皮質神経細胞および線条体神経細胞からの ACh および GABA 放出<sup>13),14),19),20)</sup> が、いずれも増大することが明らかにされている。これらの NMDA 刺激による神経伝達物質の放出促進は、NMDA が NMDA 受容体を活性化させ、細胞内において NO 生成を促進させること<sup>21)</sup> から、内因性に生成された NO により誘発されると考えられている。

上述したように、内因性に生成された NO が神経伝達物質の放出を誘発すること、神経細胞に局在する NOS が  $\text{Ca}^{2+}$  依存性であること<sup>22)</sup> および ionomycin が細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘発し、NO 生成を促進させること、などを勘案すると、ionomycin により誘発される神経細胞からの神経伝達物質放出は、NO を介した神経細胞機能修飾作用である可能性が高いと考えられるが、この点について言及した研究はなされていない。そこで本研究では、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、ionomycin により誘発される [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出を測定し、この放出と従来より知られている NO 誘発性神経伝達物質放出の薬理学的特徴とを比較検討することにより、ionomycin 誘発性神経伝達物質放出が

NO 生成を介して行われていることを明らかにすることを試みた。

### 実験材料および実験方法

#### 1) 大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

マウス大脳皮質神経細胞の単離および初代培養は、既報に準じて行った<sup>23)</sup>。すなわち、胎齢 15 日目の ddY 系マウス胎児より新皮質を摘出し、髄膜を除去した後、Ca<sup>2+</sup>-free Puck's 液中で剪刀を用いて細切し、0.1% trypsin により 37℃、5 分間の処理を加え、ついでパスツールピペットにより残存した組織片を機械的に破碎した。得られた細胞懸濁液に遠心操作 (900 g, 4℃, 2 分) を加え沈渣を得た。得られた沈渣を 15% ウシ胎児血清, 10 mM N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TE S), および 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid (HEPES) を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) により細胞数が  $3 \times 10^6$  個/ml となるように調整して浮遊させ、この細胞懸濁液の 1 ml を使用前 24 時間予め poly-L-lysine で処理した Falcon "Primaria" RT 培養皿 (直径: 35 mm) に添加した。この細胞を 37℃, 湿度 100%, air 95%/CO<sub>2</sub> 5% の条件下で 3 日間培養した。ついで 10 μM cytosine arabinoside および 10% ウマ血清を含有する DMEM 中で 24 時間培養することにより、非神経細胞の増殖の抑制を行った。その後、10% ウマ血清含有 DMEM 中で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10% ウマ血清含有 DMEM に交換し、培養後 14 日目の神経細胞を実験に使用した。なお、免疫組織学的検討などから、本研究に用いた細胞の 95% 以上が神経細胞であることが確認されている<sup>23)</sup>。

#### 2) 神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA 放出の測定

初代培養マウス大脳皮質神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA 放出の測定はすでに報告されている方法に準じて行った<sup>14)</sup>。すなわち、神経細胞を予め氷冷した 20 mM HEPES を含有する Krebs-Ringer bicarbonate Buffer (KRB-HEPES; pH 7.4,

137 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose) で 3 回洗浄後、2 nM [<sup>3</sup>H] GABA を添加し、37℃ で 60 分間の incubation を行った。その後、再び氷冷した KRB-HEPES で 3 回洗浄し、ついで 37℃ に保温した KRB-HEPES を培養皿に添加し、さらに 37℃ で 10 分間の incubation を行った。神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA の放出実験は、KRB-HEPES を 5 分毎に新鮮な KRB-HEPES に変更しつつ、合計 25 分間の incubation を行った。なお、第 1 回目の 5 分間の incubation を第 1 interval, 2 回目のそれを第 2 interval とし、5 回目のそれを第 5 interval とした。Ionomycin の添加は第 4 回目の incubation 開始直前に行った。NOS 阻害薬である N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine (M-Arg) および N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (N-Arg) は放出実験を行う前の 10 分間の incubation および放出実験に使用するすべての KRB-HEPES 中に添加した。Hemoglobin, GABA 再取り込み阻害薬である nipepicotic acid, 1-(2-(((diphenylmethylene) amino) oxy) ethyl) -1, 2, 5, 6-tetrahydro-3-pyridine-carboxylic acid (NO-711), それぞれ P/Q 型および L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネル (VDCC) 阻害薬である ω-agatoxin VIA (ω-ATX) および nifedipine, および hydroxyl radical scavenger である dimethylthiourea はいずれも ionomycin 添加直前に incubation buffer 中に添加した。放出実験において、各 interval で得られた KRB-HEPES の一部をシンチレーションバイアルに移し、KRB-HEPES 中に放出された放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。第 3 interval で放出された [<sup>3</sup>H] GABA 量を基礎放出量とし、第 4 interval で放出された [<sup>3</sup>H] GABA 量を刺激放出量とし、刺激放出量はすべて基礎放出量の百分率で表示した。

なお、放出実験には、KRB-HEPES 中に放出される [<sup>3</sup>H] GABA および神経細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H] GABA の代謝的分解を阻害するために、100 μM aminooxyacetic acid を含有し

た KRB-Hepes を用いた。

放出実験に使用した神経細胞は0.5 M NaCl により溶解して、神経細胞に含有される蛋白質量の測定に供した。

実験に使用した ionomycin はすべて dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したものをを用い、KRB-Hepes に添加する場合には、KRB-Hepes の990 ml 中に10 ml 添加するようにした。予備実験において、この濃度における DMSO は lactic dehydrogenase (LDH) の細胞外への漏出、および trypan blue 色素排泄試験の検討から、神経細胞に傷害を与えないことを確認した。

### 3) Lactic dehydrogenase (LDH) 活性の測定

Ionomycin 曝露による細胞毒性の有無について、LDH の細胞外からの漏出率について以下の如くの検討を行った。すなわち、KRB-HEPES 中に ionomycin をそれぞれ最終濃度が0.1および3 mM となるように添加し、37℃、5 分間の incubation を行ったのち、ionomycin 含有 buffer を吸引除去し、新鮮な KRB-HREPES 中で神経細胞をさらに37℃、1 時間の incubation を行った。細胞外液および細胞質内の LDH 活性を LDH Cytotoxicity Detection kit を用いて測定し、細胞外液中 LDH 活性を細胞外液中 LDH 活性および細胞質内 LDH 活性の総和で除して、その百分率を求め、LDH 活性漏出率とした。

### 4) 蛋白質の定量

神経細胞に含有される蛋白量は、神経細胞を0.5 M NaOH に溶解した試料を用い、ウシ血清 albumin を標準物質として、Lowry らの方法<sup>24)</sup>により測定した。

### 5) 統計学的解析

得られたのデータはすべて mean  $\pm$  S.E.M. で表示した。統計的有意差の検討は one-way ANOVA の適用後、それぞれの図説明中に記載した統計法により処理することにより行った。

### 6) 試薬

[<sup>3</sup>H] GABA (2,819 GBq/mmol) は New England Nuclear (Boston, U.S.A.) より購入した。Ionomycin, nifedipine および hemoglobin

は Sigma Chemicals (St. Louis, U.S.A.) の製品を使用した。また、 $\omega$ -ATX はペプチド研究所 (大阪) より入手した。LDH Cytotoxicity Detection kit はタカラ (東京) より購入した。その他の実験に使用した試薬は市販の特級試薬を用いた。

## 実験結果

### 1) Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出における NO の関与

Ionomycin は初代培養マウス大脳皮質神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA 放出を用量依存性に増加させた (Fig. 1)。すなわち、ionomycin は1  $\mu$ M までの濃度範囲において濃度依存性に [<sup>3</sup>H] GABA 放出を増加させた (Fig. 1)。一方、生理学的な神経細胞膜の発火に類似した神経細胞膜の発火を誘発する30 mM KCl によっても有意な [<sup>3</sup>H] GABA の放出増加が生じ、その放出の程度は0.1~0.3  $\mu$ M の ionomycin により誘発された [<sup>3</sup>H] GABA 放出の程度とほぼ同様であった (Fig. 1)。

0.1  $\mu$ M ionomycin の存在下では LDH の細胞外漏出は対照群と比較して変化が認められなかつ

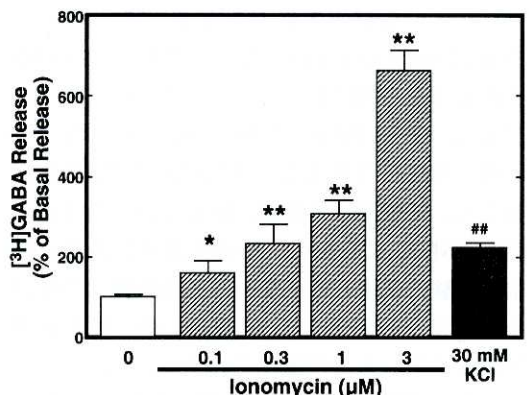


Fig. 1. Effects of ionomycin and 30 mM KCl on [<sup>3</sup>H] GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared with the value determined in the absence of ionomycin and KCl (Dunnett's test). ##p < 0.01, compared with the value determined in the absence of ionomycin and KCl (Bonferroni's test).

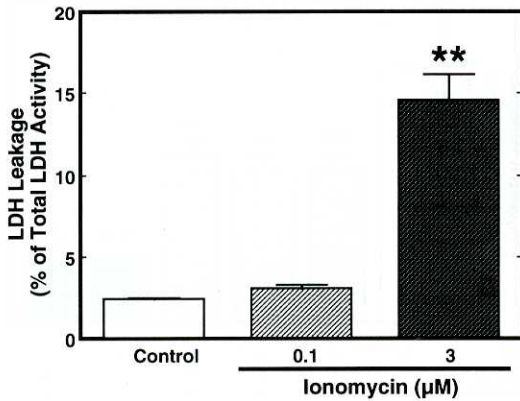


Fig. 2. Effect of ionomycin on leakage of lactic dehydrogenase (LDH) from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \*\* $p < 0.05$ , compared with the value determined in the absence of ionomycin.

た。一方、 $3 \mu\text{M}$  濃度の ionomycin は著明な  $[^3\text{H}]$ GABA の細胞外へ漏出を誘発し、しかも LDH の細胞外漏出が有意に増加したことから (Fig. 2), この濃度では神経細胞膜の傷害が生じ、 $[^3\text{H}]$ GABA も細胞外へ漏出すると考えられた。従って、 $30 \text{ mM}$  KCl による  $[^3\text{H}]$ GABA 放出量と ionomycin 誘発性  $[^3\text{H}]$ GABA 放出量との比較、および LDH 活性の細胞外への漏出率とから、以下の実験においては  $0.1 \mu\text{M}$  の ionomycin を用いた。

Ionomycin が細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を介して NOS 活性を亢進させ、NO 生成の亢進とこれに伴う  $[^3\text{H}]$ GABA 放出を誘発させる可能性について、まず NOS 阻害薬である M-Arg および N-Arg を用い、NO 生成の阻害による変化について検討した。その結果、Figure 3 に示すように、M-Arg は用量依存性に ionomycin 誘発性  $[^3\text{H}]$ GABA 放出を抑制し、 $100 \mu\text{M}$  の濃度では ionomycin の  $[^3\text{H}]$ GABA 放出促進作用は完全に消失するのが観察された。同様に、 $100 \mu\text{M}$  の N-Arg も完全に ionomycin 誘発性  $[^3\text{H}]$ GABA 放出を抑制した (Fig. 3)。

また、細胞外液中に NO scavenger である hemoglobin が存在する条件下においても、ionomycin 誘発性  $[^3\text{H}]$ GABA 放出は濃度依存性に抑制され、 $40 \mu\text{M}$  の hemoglobin の共存に

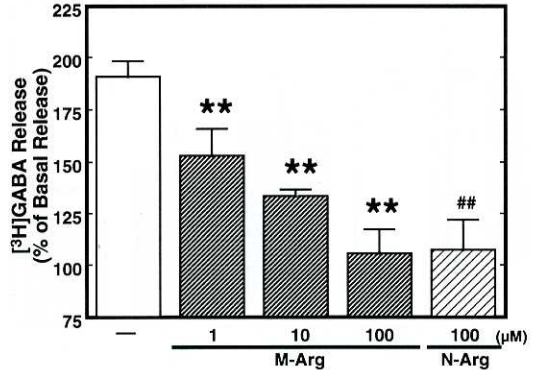


Fig. 3. Effects of  $\text{N}^G$ -methyl-L-arginine (M-Arg) and  $\text{N}^w$ -nitro-L-arginine (N-Arg) on ionomycin ( $0.1 \mu\text{M}$ )-evoked  $[^3\text{H}]$ GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Dunnett's test). ## $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Bonferroni's test).

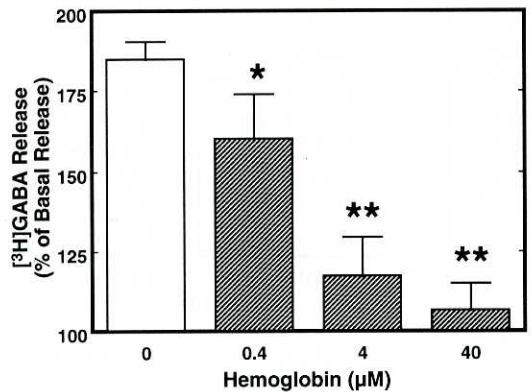


Fig. 4. Effect of hemoglobin on ionomycin ( $0.1 \mu\text{M}$ )-evoked  $[^3\text{H}]$ GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Dunnett's test).

より、その放出は完全に抑制された (Fig. 4)。

これらに実験成績から、ionomycin の  $[^3\text{H}]$ GABA 放出促進作用は、NO 生成を介して誘発されると考えられる。

## 2) Ionomycin 誘発性 $[^3\text{H}]$ GABA 放出の薬理学的特性

Ionomycin 誘発性  $[^3\text{H}]$ GABA 放出が NO 生成を介した変化であること、および NO により

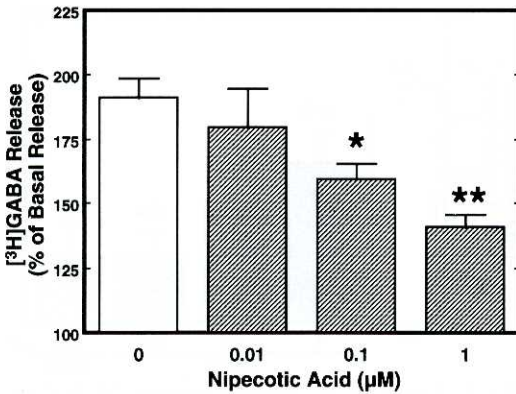


Fig. 5. Effect of nipecotic acid on ionomycin ( $0.1 \mu\text{M}$ ) - evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Dunnett's test).

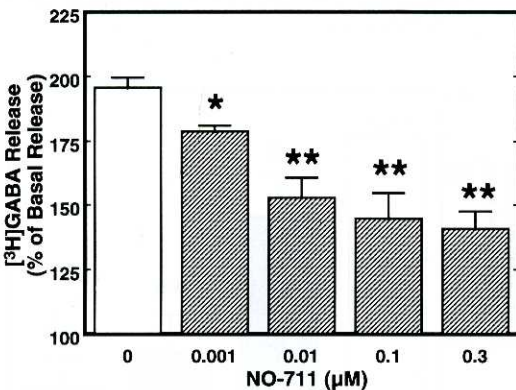


Fig. 6. Effect of NO-711 on ionomycin ( $0.1 \mu\text{M}$ ) - evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Dunnett's test).

活発される神経伝達物質放出は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性と  $\text{Na}^+$  依存性 GABA 担体輸送系の逆過程の2つの放出機構により行われていることが、報告されている<sup>25)</sup>。Ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出の特性について検討を加えた。

Ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出は、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下において  $\text{Na}^+$  依存性 GABA 担体輸送系の阻害薬である nipecotic acid および NO-711 によりいずれも用量依存性に抑制され (Fig. 5, 6), それぞれ 1 および  $0.1 \mu\text{M}$  の濃度において最大の抑制作用を示した。これら  $\text{Na}^+$  依

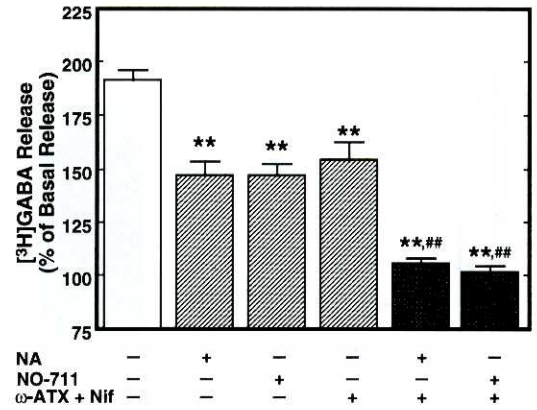


Fig. 7. Effects of nipecotic acid (NA), NO-711,  $\omega$ -agatoxin VIA ( $\omega$ -ATX), and nifedipine (Nif) on ionomycin ( $0.1 \mu\text{M}$ ) - evoked [ $^3\text{H}$ ] GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Bonferroni's test). # $p < 0.05$ , compared with the values determined in the presence of ionomycin + Na or ionomycin + NO-711 (Bonferroni's test).

存性 GABA 担体輸送阻害薬の最大抑制作用を示す濃度における ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出 NO 抑制率はいずれも約50%であった (Fig. 5, 6).

NO が神経細胞膜上に存在する VDCC に対し、L 型および P/Q 型 VDCC を活性化させる一方、N 型 VDCC を抑制すること<sup>26)</sup>が報告されていることから、それぞれの拮抗薬である nifedipine および  $\omega$ -ATX を同時に放出実験系に添加により、Figure 7 に示すように ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出は約50%低下し、さらに nipecotic acid ないしは NO-711 を反応系に添加した場合には、ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出の放出は消失した (Fig. 7).

Hydroxyl radical scavenger により hydroxyl radical を放出実験系から除去することにより、NO 誘発性神経伝達物質放出が増強されることがすでに報告されている<sup>27)</sup>。そこで本研究では、ionomycin 誘発性 [ $^3\text{H}$ ] GABA 放出が hydroxyl radical scavenger の1つである dimethylthiourea を放出実験系に添加することにより検討を行った。その結果、dimethylthiourea は用量依存性

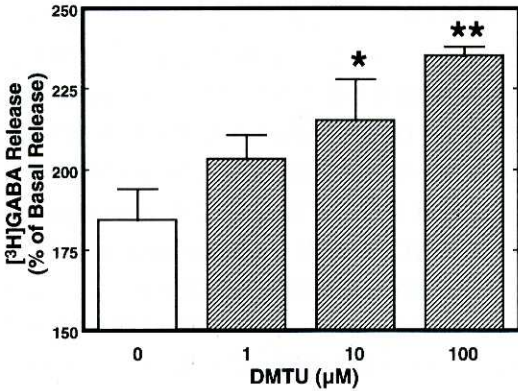


Fig. 8. Effect of dimethylthiourea (DMTU) on ionomycin (0.1 μM)-evoked [<sup>3</sup>H] GABA release from mouse cerebral cortical neurons. Each value was obtained from four separate experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared with the value determined in the presence of ionomycin alone (Dunnett's test).

に ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出を増強した (Fig. 8).

## 考 察

Ca<sup>2+</sup> ionophore の 1 つである ionomycin はその細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入促進作用から、神経化学および神経薬理学的研究などにおいて、Ca<sup>2+</sup> 依存性神経伝達物質放出などを誘発させる手段の 1 つとして広く応用されてきた。さらに、近年 ionomycin が NO 生成促進作用を有することが明らかにされてきており<sup>4)~9)</sup>、一方、NO が神経細胞において神経伝達物質放出促進作用を有することが知られてきている。これらの観点を勘案すると、ionomycin 誘発性神経伝達物質放出作用が NO の生成を介した可能性が考えられ、本研究ではこの点を明らかにする目的で行われた。

Ionomycin は本研究で示したように、初代培養マウス大脳皮質神経細胞から用量依存性に神経伝達物質放出を誘発する。しかしながら、本研究で用いた神経細胞に対しては、3 μM より高い濃度では LDH 漏出量が著明に増大するのが認められ、ionomycin による神経細胞膜傷害が生じていることは明らかと考えられる。事

実、従来より高濃度では ionomycin が細胞毒性を示すことが知られている<sup>28), 29)</sup>。また、本研究で使用した神経細胞の場合、ionomycin 非処理細胞において認められた LDH 活性の細胞外への漏出率は既報のそれにほぼ一致していた<sup>30)</sup>。従って、本研究では [<sup>3</sup>H] GABA 放出の促進には 0.1 μM ionomycin を使用した。

Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は NOS 阻害薬である M-Arg および N-Arg の共存下において有意に抑制されていることから、この ionomycin の神経伝達物質放出促進作用は ionomycin により神経細胞内において生成された内因性 NO により生じていることは明らかと考えられる。同様に、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体刺激により生成される内因性 NO によっても神経伝達物質放出が誘発されることが報告されている<sup>13), 31), 32)</sup>。さらに、NO scavenger である hemoglobin の細胞外液中への添加により ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出が有意に抑制されている。本研究で用いた hemoglobin の分子量が約 60 kDa であることから、このような大分子が放出実験における 5 分間の反応時間中に神経細胞へ取り込まれる可能性は極めて低いと考えられることから、ionomycin により神経細胞内において生成された NO は細胞膜を通過したのち、細胞膜外側より作用して神経伝達物質放出を誘発しているものと考えられる<sup>13), 32)</sup>。従って、ionomycin による [<sup>3</sup>H] GABA 放出促進作用は神経細胞内において生成された NO を介して行われることは確実であると考えられる。

NO により誘発される神経伝達物質放出にはいくつかの薬理学的特性が認められる。そこで、本研究では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出が NO を介していることを確認するために、これらの薬理学的特性を検討した。最近の多くの研究から神経細胞からの神経伝達物質放出は Ca<sup>2+</sup> 依存性放出機構および Na<sup>+</sup> 依存性神経伝達物質担体輸送系の逆過程を介して行われることが明らかにされており<sup>33)</sup>、NO もまた Ca<sup>2+</sup> 依存性放出機構および Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体

輸送系の逆過程の2つの異なる GABA 放出機構により GABA の放出を誘発することが報告されている<sup>25)</sup>。これらの観点から、まず本研究では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出がこれら2つの異なる GABA 放出機構により行われているか否かについて検討した。本研究において Ca<sup>2+</sup> 存在下では Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系阻害薬である nipecotic acid および NO-711 はいずれも用量依存性に ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出を抑制するのみならず、その最大抑制作用発現時においては、約50%が阻害され、このことから、この阻害された部分は、Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系であることが明らかとなった。一方、NO generator により誘発される [<sup>3</sup>H] GABA 放出は Ca<sup>2+</sup> の反応系の除去あるいは Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系阻害薬によりそれぞれ約50%の抑制がみられ、さらに反応液中からの Ca<sup>2+</sup> 除去と Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系阻害薬の添加を同時に行った場合には、その放出は完全に消失している<sup>25)</sup>。従って、本研究でみられた Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系阻害薬の添加による ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出の抑制は NO 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出の場合と類似しているのみならず<sup>33)</sup>、この操作によりみられる ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出の抑制の程度と NO 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出の程度<sup>25)</sup> もまたほとんど一致している。従って、これらの実験成績から、ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は NO 生成を介した変化であることを支持すると考えられる。

Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出における細胞外 Ca<sup>2+</sup> 流入に起因する Ca<sup>2+</sup> 依存性 GABA 放出を検討する場合、細胞外 Ca<sup>2+</sup> の除去を行うことによる検討を行えない。しかしながら、NO は神経細胞膜の発火を誘発する<sup>26), 34), 35)</sup> とともに、その結果として VDCC を開口させて細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入の増加をもたらす<sup>26)</sup> が、N 型 VDCC に対して NO は抑制的に作用することが報告されている<sup>26)</sup>。しかも NO により誘発される Ca<sup>2+</sup> 流入は L 型および

P/Q 型 VDCC 阻害薬の共存により完全に阻害される<sup>26)</sup>。そこで本研究ではこの NO の VDCC に対する作用を応用して ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出のうちの Ca<sup>2+</sup> 依存性放出について検討したところ、それぞれ L 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬である nifedipine および  $\omega$ -ATX の共存下では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は約50%阻害され、この条件下にさらに nipecotic acid あるいは NO-711 の添加によりその放出が完全に消失することが明らかにされた。これらの実験成績は ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出の約50%が Ca<sup>2+</sup> 依存性放出機構により、また残余の約50%が Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送系の逆過程を介して行われていることを意味すると判断される。

NO は superoxide との化学的反応による peroxynitrite の形成後、さらに分解されて hydroxyl radical を生成する<sup>36), 37)</sup>。この生成された hydroxyl radical が NO 誘発性神経伝達物質放出を修飾することがすでに報告されている。すなわち、hydroxyl radical scavenger により hydroxyl radical を除去すると、神経細胞からの acetylcholine および GABA 放出の増大が生じると報告されている<sup>27), 38)~40)</sup>。本研究において、hydroxyl radical scavenger として dimethylthiourea を用いて ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出に及ぼす影響を検討したところ、dimethylthiourea は明らかにその放出を増強していた。この実験成績は本研究で示した他の実験成績と同様に、ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出が NO 生成を介して生じていることを支持する所見であると考えられる。

## 結 語

Ca<sup>2+</sup> ionophore である ionomycin が Ca<sup>2+</sup> 依存性神経伝達物質放出を誘発すること、および NO 生成を誘発すること、さらに NO が神経伝達物質放出を促進させることから、本研究では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出における NO の機能的役割を初代培養マウス大脳皮質神



経細胞を用いて検討し、以下の結果を得た。

- 1) Ionomycin は、神経細胞からの [<sup>3</sup>H] GABA 放出を用量依存性に増加させた。
- 2) Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は、NO scavenger である hemoglobin および NO 合成酵素阻害薬である M-Arg および N-Arg により用量依存性に抑制された。
- 3) Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送阻害薬である nipepicotic acid および NO-711 は用量依存性に ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出を抑制し、その最大抑制作用出現時には ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は約 50% 減少した。
- 4) それぞれ L 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬である nifedipine および ω-ATX の共存下では ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は約 50% 減少し、さらにこの条件下に nipepicotic acid あるいは NO-711 を反応件に添加することにより ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は完全に消失した。
- 5) Ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は hydroxyl radical scavenger である dimethylthiou-

rea により用量依存性に増加した。

- 6) 以上の実験成績から、ionomycin 誘発性 [<sup>3</sup>H] GABA 放出は ionomycin による細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入に引き続く NOS 活性化とこれに伴うの生成を介して誘発されると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室 大熊誠太郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究を遂行するに当たり、種々の御指導を賜りました川崎医科大学循環器内科学教室 澤山俊民前教授、吉田清教授に深謝いたします。また、実験について直接御助言、御指導を頂いた川崎医科大学薬理学教室 桂 昌司先生に謝意を表するとともに、本研究の遂行にご協力頂いた薬理学教室員各位にも御礼申し上げます。また本研究の遂行に当たり御協力頂いた、RI センターおよび生化学センターの皆様にも厚くお礼申し上げます。なお、本研究の一部は文部省科学研究費（基盤 B (2) 10557247）の援助により行われました。

## 文 献

- 1) Liu C-M, Hermann TE : Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253 : 5892 - 5894, 1978
- 2) Beeler TJ, Jona I, Martonosi A : The effect of ionomycin on calcium influxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 254 : 6229 - 6231, 1979
- 3) Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM : Presynaptic inhibition of calcium-dependent and-independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and α-latroxin in the hippocampus. *J Neurophysiol* 75 : 2017 - 2028, 1996
- 4) Reiser G : Endothelin and a Ca<sup>2+</sup> ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 101 : 722 - 726, 1990
- 5) Alagarsamy S, Lonart G, Johnson KM : Regulation of nitric oxide synthetase activity in cortical slices by excitatory amino acids and calcium. *J Neurosci Res* 38 : 648 - 653, 1994
- 6) Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M : Activation of NO : cGMP pathway by acetylcholine in bovine chromaffin cells. Possible role of Ca<sup>2+</sup> in the down-regulation of cGMP signaling. *Biochem Pharmacol* 50 : 763 - 769, 1996
- 7) Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS : Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193 : 722 - 729, 1993
- 8) Kemp BK, Smolich JJ, Ritchie BC, Cocks TM : Endothelium-dependent relaxations in sheep pulmonary arteries and veins : resistance to block by NG-nitro-L-arginine in pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 116 : 2457 - 2467, 1995

- 9) He P, Liu B, Curry FE : Effect of nitric oxide synthetase inhibitors on endothelial  $[Ca^{2+}]_i$  and mic-rovessel permeability. *Am J Physiol* 272 : H 176 – H 185, 1997
- 10) Zhu X-Z, Luo L-G : Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem* 59 : 932 – 935, 1992
- 11) Prast H, Philippu A : Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur J Pharmacol* 216 : 139 – 140, 1992
- 12) Ohkuma S, Katsura M., Guo J-L, Hasegawa T, Kuriyama K : Participation of peroxynitrite in acetylcholine release induced by nitric oxide generators. *Neurosci Lett* 183 : 151 – 154, 1995
- 13) Ohkuma S, Katsura M, Guo J-L, Hasegawa T, Kuriyama K : Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 31 : 185 – 193, 1995
- 14) Ohkuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K : Nitric oxide-induced  $[^3H]$  GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem* 65 : 1109 – 1114, 1995
- 15) Lonart G, Wang J, Johnson KM : Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 220 : 271 – 272, 1992
- 16) Blandini P, Johnson D, Walcott J, Goldfarb J : Release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamus by stimulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 263 : 61 – 68, 1992
- 17) Krebs MO, Desce JM, Kemel ML, Gauchy C, Godehue G, Cheramy A, Growinski J : Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum : Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors of dopaminergic nerve terminals. *J Neurochem* 56 : 81 – 85, 1991
- 18) Martinez-Fong D, Rosales MG, Gongora-Alfaro JL, Hernandez S, Aceves J : NMDA receptor mediates dopamine release in the striatum of unanesthetized rats as measured by brain microdialysis. *Brain Res* 595 : 309 – 315, 1992
- 19) Drejer J, Honore T, Schousboe A : Excitatory amino acid-induced release of  $^3H$  -GABA from cultured mouse cerebral cortex interneurons. *J Neurosci* 7 : 2910 – 2916, 1987
- 20) Pin J-P, Van-Vliet BJ, Bockaert J : NMDA- and kainate-evoked GABA release from striatal neurones differentiated in primary culture : differential blocking by phencyclidine. *Neurosci Lett* 87 : 87 – 89, 1988
- 21) Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH : A novel neuronal messenger molecule in brain : The free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32 : 297 – 311, 1992
- 22) Snyder SH : Nitric oxide and neurons. *Curr Opin Neurobiol* 2 : 323 – 327, 1992
- 23) Ohkuma S, Tomono S, Tanaka Y, Kuriyama K, Mukainaka T : Development of taurine biosynthesizing system in cerebral cortical neurons in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 4 : 383 – 395, 1986
- 24) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265 – 275, 1951
- 25) Ohkuma S, Katsura M, Chen D-Z, Narihara H, Kuriyama K : Nitric oxide-evoked  $[^3H]$   $\gamma$ -aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms. *Mol Brain Res* 36 : 137 – 144, 1996
- 26) Ohkuma S, Katsura M, Hibino Y, Xu J, Shirohara K, Kuriyama K : Multiple actions of nitric acid on voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 54 : 133 – 140, 1998
- 27) Ohkuma S, Katsura M, Chen D-Z, Narihara H, Kuriyama K : Removal of hydroxyl radical increases nitric oxide generators-induced  $[^3H]$  GABA release from mouse cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* 194 : 101 – 104, 1995
- 28) Kaneko S, Maeda T, Kume T, Kochiyama H, Akaike A, Shimohama S, Kimura J : Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha 7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res* 7654 : 135 – 40, 1997
- 29) Shimohama S, Akaike A, Kimura J : Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity -Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation-. *Ann NY Acad Sci* 777 : 356 – 61, 1996
- 30) Ohkuma S, Chen S-H, Katsura N, Chen D-Z, Kuriyama K : Muscimol prevents neuronal injury induced by NMDA.

Jpn J Pharmacol 64 : 125 - 128, 1994

- 31) Hanbauer I, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA : Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [<sup>3</sup>H] - dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3 : 409 - 412, 1992
- 32) Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ : Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263 : 973 - 977, 1994
- 33) Levi G, Raiteri M : Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* 16 : 415 - 419, 1993
- 34) Wu SY, Dun SL, Forstermann U, Dun NJ : Nitric oxide and excitatory postsynaptic currents in immature rat sympathetic preganglionic neurons in vitro. *Neurosci* 79 : 237 - 245, 1979
- 35) Bains JS, Ferguson AV : Nitric oxide depolarizes type II paraventricular nucleus neurons in vitro. *Neurosci* 79 : 149 - 159, 1997
- 36) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620 - 1624, 1990
- 37) Pfeiffer S, Gorren ACF, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle S, Mayer B : Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution - Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in 2 : 1 stoichiometry-. *J Biol Chem* 272 : 3465 - 3470, 1997
- 38) Ohkuma S, Katsura M, Chen D-Z, Narihara H, Kuriyama K : Facilitation of N-methyl-D-aspartate-evoked acetylcholine release by hydroxyl radical scavengers. *Neuroreport* 6 : 2033 - 2036, 1995
- 39) Ohkuma S, Katsura M, Chen D-Z, Guo J-L, Kuriyama K : Hydroxyl radical scavengers enhance nitric oxide-evoked acetylcholine release from mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 34 : 347 - 350, 1995
- 40) Ohkuma S, Katsura M, Hibino Y, Hara A, Shirotani K, Ishikawa E, Kuriyama K : Mechanisms for facilitation of nitric oxide-evoked [<sup>3</sup>H] GABA release by removal of hydroxyl radical. *J Neurochem* 71 : 1501 - 1510, 1998