

脱分極で発生する外向き電流に対する セロトニンの増強効果

物理学 川崎 敏・佐々木和彦*

The Augmenting Effect of Serotonin on the Depolarization-Induced
Outward Currents Recorded from the Ganglion Cells of *Aplysia*.

Satoshi KAWASAKI and Kazuhiko SASAKI

Abstract

In *Aplysia* abdominal ganglion cells, application of 5-hydroxytryptamine (5HT) prolongs the spike duration evoked by artificial depolarizing pulses in the presence of tetraethylammonium chloride (TEA). In contrast, it does not alter the spike duration in normal perfusing media. In attempt to clarify this lack of effect of 5HT in the normal media, voltage clamp method was used. Application of 5HT induced slow voltage-dependent inward current carried by Na^+ in the cells clamped at resting level. Furthermore, 5HT augmented a transient inward current followed by slow outward current response elicited by depolarizing pulse from resting level to +10mV. Application of 10mM TEA markedly depressed the outward current component without affecting the fast inward component, indicating the outward current component sensitive to TEA to be mainly Ca^{2+} -activated K^+ -current. In the presence of TEA, 5HT rather depressed the remaining outward current component and shifted the maximum level to inward. The apparent inward shift of the outward current by 5HT was inhibited by Cd^{2+} , a typical Ca^{2+} -channel blocker, suggesting the inward shift was due to increase in Ca^{2+} -current. Furthermore, 5HT-induced augmentation of the outward current was not observed in the presence of Cd^{2+} alone dissolved in normal media. These results suggested that 5HT facilitate the opening of voltage-dependent Ca^{2+} -channel, causing an increase in Ca^{2+} -current, and subsequently enhancing the TEA-sensitive Ca^{2+} -activated K^+ -current. Our model explains why 5HT in normal media lacks the prolonging effect on the spike duration.

I. はじめに

神経細胞の終末や内分泌腺細胞においては、細胞膜が静止膜電位から+50mV程度にまで脱分極して活動電位を発生し膜電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外液から Ca^{2+} が流入して伝達物質やホルモンの放出を引き起こす。これら伝達物質やホルモンの放出量は、活動電位発生時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大に依存する。*Aplysia*の神経細胞にはセロトニン(5HT)受容体をもつ細胞があり、その受容体刺

激によって10mV程度脱分極してスパイクの発火頻度が上昇する¹⁻³⁾。Kandel等は活動電位を発生させながら5HTを投与するとそのスパイク幅が広くなり⁴⁾、その結果この細胞の神経終末では Ca^{2+} 流入が増大し、伝達物質の放出が増大すると考えている。しかしながら、この5HTによるスパイク幅の増大は、スパイク幅の変化を記録しやすくするために、細胞外液にtetraethylammonium chloride (TEA)を混ぜ、スパイク幅をあらかじめ広くした条件

* 岩手医科大学医学部生理学第一講座

下で観察された。われわれは同じ細胞を用いて、外液に TEA を混ぜた場合には 5HT によってスパイク幅は広がるが、TEA を混ぜないときには 5HT によってスパイク幅がほとんど変化しないことを観察した。このことから、5HT によって、スパイク幅を広げる作用と狭くする作用が同時に働いていることが考えられた。スパイク幅を広げる作用は Ca^{2+} 電流の増大または K^{+} 電流の減少により引き起こされ、スパイク幅の減少はこれと逆のことが起きれば発現する。実際、われわれは、この細胞を膜電位固定法下、脱分極パルスを与えたときに発生する外向き K^{+} 電流が、5HT によって著しく増大することを見いだした。本研究では、この 5HT によって増大する外向き電流のイオン種について調べた。

II. 方法

1. 標本と灌流液

Aplysia kurodai の腹部神経節を摘出し、灌流槽に固定した。神経節細胞を覆っている結合組織を実体顕微鏡下で注意深く除去し、細胞を灌流液中に露出させた。灌流液は *Aplysia* の血液に似せた人工血液とし、そのイオン組成は、 Na^{+} 587、 K^{+} 12、 Cl^{-} 671、 Ca^{2+} 14、 Mg^{2+} 52 mM であり、pH は Tris と HCl で 7.4 に調整した。灌流液の流速は 5ml/min に、液温は $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に常に保った。灌流槽の容量は 0.2ml である。

2. 電気的測定方法

実体顕微鏡下で、1.8M K-citrate を詰めた二本のガラス微小電極（電気抵抗 2~3M Ω ）を腹部神経節の R_C または R_B グループ⁵⁾の細胞に刺入した。一本の電極は、膜電位変化を記録するため Dagan 8500 clamp 装置の preamplifier の入力に接続した。もう一方は、細胞膜を横切って電流を流すために clamp 装置の current output に接続した。膜を横切って流れる電流は、同じ装置の operational amplifier の virtual ground を介して測定した。

3. 静止膜における 5HT 応答の測定

膜電流固定法下、あるいは膜電位固定法下、5HT 応答を灌流槽へ投与したときに発生する細胞の静止膜電位での電位応答または電流応答を測定した。膜電流固定法下では、repetition rate 0.2Hz で duration 800ms、振幅 5nA の矩形波電流を膜を横切って流して応答発生時の膜抵抗変化を測定した。膜電位固定法下では、repetition rate 0.2Hz で duration 800ms、振幅 5 mV の過分極パルスを与えて応答発生時の膜コンダクタンス変化を測定した。

4. スパイクの発生方法と 5HT 投与によるスパイク幅変化の測定

静止膜電位にある神経細胞に活動電位を発生させるため、通電用電極から膜を横切って duration 2ms、電流値 10~15nA の外向き電流パルスを流し、膜の R-I drop により、閾膜電位 (CFL) 以上に脱分極させた。

用いた細胞では、5HT 投与時、受容体の活性化によって膜が脱分極して自発発火ようになる。この場合にはパルス電流に重畳して内向きの電流を流して、膜電位を 5HT 投与前の膜電位に戻してから活動電位を発生させた。

5. 脱分極パルスによって発生する外向き電流に対する 5HT の効果の測定

膜電位固定法により、duration 300ms で静止膜から矩形の脱分極パルスを与えて外向きの電流を発生させた。この脱分極パルスを 15 秒おきに与えながら、5HT 投与時の外向き電流の変化を測定した。発生する電流波形はメモリーオシロスコープと X-Y プロッタにて記録した。

6. 使用薬剤

5HT (serotonin, Sigma Co.) は灌流液に溶かし、細胞外から投与した。5HT は濃度 0.1 mM にし、投与時間は最大応答が観察できるよう 20s とした。5HT の投与後は、少なくとも 10~20 分間 wash out した。TEA (tetraethylammonium chloride, 関東化学株式会社) と

Cd^{2+} は、それぞれ Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルと Ca^{2+} チャンネルをブロックする目的で、*Aplysia* 人工血液に溶かして細胞外投与した。EGTA (ethyleneglycol-bis- (β -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetic acid, 和光純薬工業) は、200mM の KCl 溶液に溶かし、細胞内に投与した。このとき電流電極として二連ガラス微小電極を用いた。二連電極の一方には 1.8M K-citrate を満たして電流を流すための電極とし、他方には EGTA を充填し圧注入装置に接続した。充填した EGTA は duration 100~200 msec, 1~2kg/cm² の pressure pulse により細胞内に圧注入した。注入された EGTA の細胞内濃度は、実験に使用した細胞の体積と電極から放出される droplet との体積比から概算して求めた。

Ⅲ. 結果

1. 5HT によるスパイク幅の増大作用

Aplysia 腹部神経節の R_B または R_C グループの細胞は、膜電位記録下 0.1mM 5HT を投与すると静止膜がゆっくりと脱分極し、スパイクの発火頻度が上昇する。この細胞の電位を静止膜電位に固定して、5HT を投与すると膜の slope conductance の減少を伴った内向き電流応答が見られる (Fig. 1A)。既に報告したように、この内向き電流は電圧依存性の Na^+ チャンネルが開いて生じる⁶⁾。この型の細胞で 10 mM TEA 存在下、細胞に duration 2ms の外向き電流パルスを通して膜を CFL より脱分極させると、Fig. 1B に示すような活動電位が発生する。このとき、0.1mM 5HT を投与するとスパイク幅は著しく増大した。スパイク幅の増大の割合は、5HT が無いときの 150~200% であった。同様の結果は、Kandel 等によっても報告されている⁴⁾。しかしながら、*Aplysia* 人工血液中で同様の実験を試みたところ、5HT 投与で脱分極はしたがスパイク幅はほとんど変化しなかった (Fig. 1C)。

2. 脱分極パルスで発生する外向き電流とその 5HT による増大作用

同じ型の細胞で膜電位固定下、静止膜から 0 mV までの脱分極パルスを与えると、過渡的な内向き電流に続き大きな外向き電流が発生する。この時 5HT を投与すると、脱分極パルスで発生する外向き電流は著しく増大した (Fig. 2Aa, Ba)。1~10mM 程度の TEA は BK (Big conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel) 型⁷⁾ Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルをブロックすることが知られている⁸⁾。10mM TEA 存在下では、脱分極パルスで発生する外向き電流はほぼ完全にブロックされた (Fig. 2Ab, Bb)。同時に 5HT による外向き電流の増大作用も消失し、残存する外向き電流は 5HT でむしろわずかながら減少した (Fig. 2Ac, Bc)。さらに、 Ca^{2+} チャンネルをブロックする目的で 0.3mM Cd^{2+} を加えたときには、TEA 単独の時よりも脱分極で発生する外向き電流は増大した (Fig. 2Ad, Bd)。この条件下で、5HT を投与しても外向き電流はほとんど変化しなかった (Fig. 2Ae, Be)。また、細胞内に Ca^{2+} のキレート剤である EGTA を注入したときも、脱分極パルスで発生する外向き電流はほぼ完全にブロックされ、5HT による外向き電流の増大作用も消失した (図省略)。したがって脱分極パルスで生じる外向き電流のほとんどは Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流であり、5HT はこれを増大させていることが示唆された。

3. 膜電流—電圧特性に対する 5HT の効果

脱分極パルスによって発生する外向き電流を、脱分極パルスの大きさを変えて測定し、電流—電圧曲線 ($I_{\text{depol}}-V_m$ curve) を求めた (Fig. 3A)。電流値は 150ms の時点の値を用いた。この $I_{\text{depol}}-V_m$ curve は、+60mV に極大値をもつ、いわゆる N 字型の“こぶ”をもった特性を示した。Meech 等は、この“こぶ”の部分の電流成分は、 Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流であることを示した⁹⁾。5HT を投与すると、この $I_{\text{depol}}-V_m$ curve の“こぶ”の部分だけが増大した。0.3 mM Cd^{2+} 存在下での $I_{\text{depol}}-V_m$ curve は、*Aplysia* 人工血液中の場合と比べ、“こぶ”の部分は大きく減少した (Fig. 3B)。しかも、5HT を

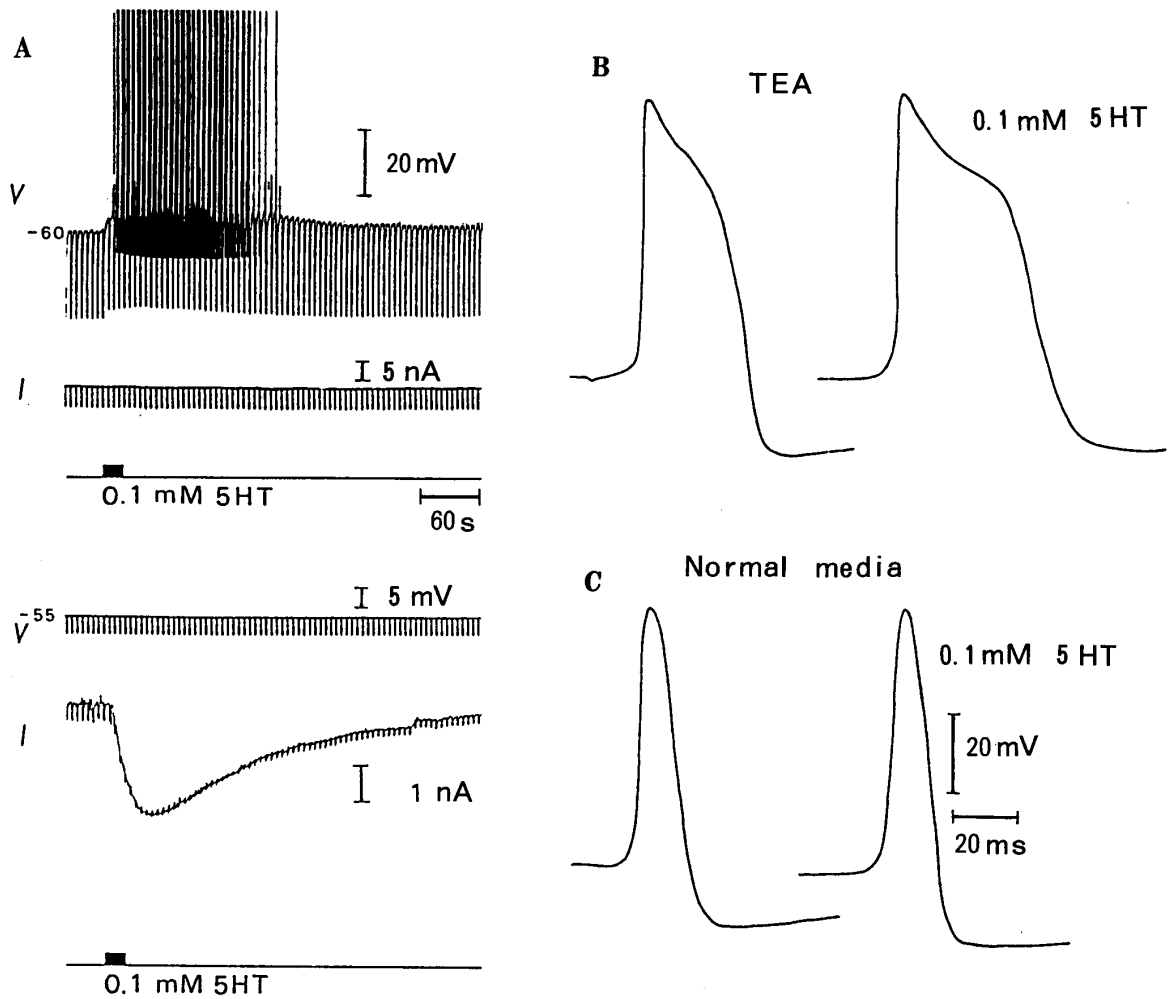


Fig. 1 5HT-induced responses of a neuron in the Rc cluster of *Aplysia* abdominal ganglion. **A**: Slowly depolarizing response with spike firings was recorded under current clamp (top). Periodic downward deflections in the voltage record (V) show the electronic potentials induced by constant 800 ms inward current pulses (I) delivered every 5 s, indicating the changes in effective membrane resistance. Slow inward current response (I) of the same cell to 5HT was recorded under the voltage clamp at -55 mV (bottom). The mode of voltage clamp is shown above. **B**: In the presence of 10 mM TEA, stimulation of 5HT receptor on the same cell prolonged the spike duration. Spikes were artificially evoked by depolarizing current pulses with a duration of 2 ms applied every 5 s under current clamp. **C**: In normal perfusing media, the spike duration was not affected by 5HT significantly.

投与しても $I_{\text{depol}}-V_m$ curve にはほとんど変化がなかった。

4. 電流-電圧特性に対する TEA と Cd^{2+} の効果

10mM TEA 存在下では、 $I_{\text{depol}}-V_m$ curve の“こぶ”の部分は完全に消失した (Fig. 4A)。同時に、5HT による外向き電流増大効果も消失した。脱分極の膜電位が $+60\text{mV}$ 以下の場合

は、残存する外向き電流は 5HT によって減少し、それ以上の電位においてはわずかながら増大した。また、10mM TEA と 0.3mM Cd^{2+} 存在下では、TEA 存在下に比し、脱分極で発生する外向き電流は $+60\text{mV}$ 以下でわずかに増大し、 $+60\text{mV}$ 以上で減少した (Fig. 4B)。このとき、5HT 投与による $I_{\text{depol}}-V_m$ curve の変化は、TEA 存在下での変化と同様の傾向を示したがその変化量は小さかった。また、脱分極パルス

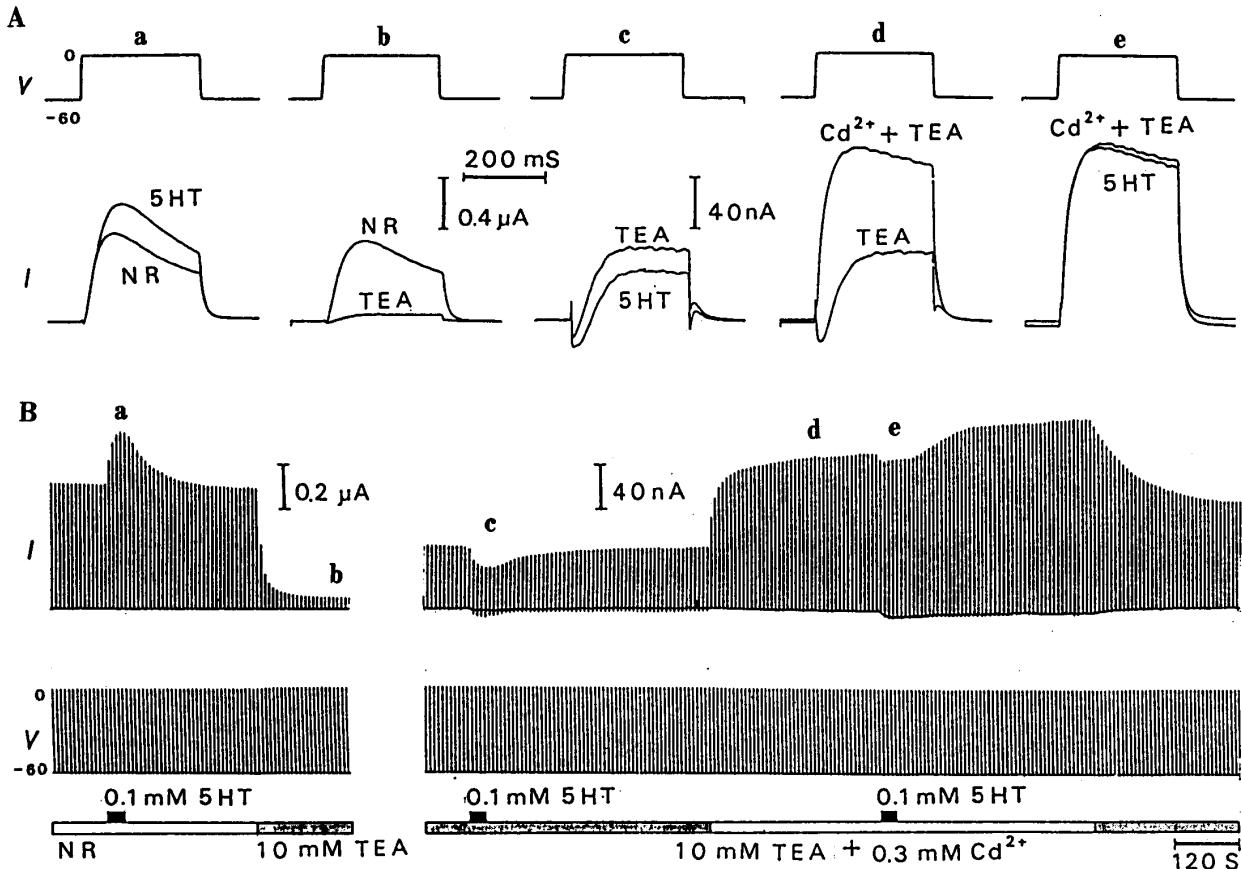


Fig. 2 Effect of 5HT on outward current response to depolarizing pulse. The outward current elicited by 300 ms voltage steps from -60 to 0 mV was augmented by application of 0.1 mM 5HT in normal perfusing media (NR) as shown in Aa. In the presence of 10 mM TEA, the outward current induced by depolarizing pulse was markedly blocked (Ab), and the remaining outward current was depressed by 5HT (Ac). Following the addition of 0.3 mM Cd^{2+} increased the outward current (Ad) and blocked the 5HT-induced augmenting effect (Ae). Continuous chart recording of the depolarization-induced outward-currents is shown in B.

の初期に現われる内向き電流成分は消失した。

IV. 考察

本研究により、静止膜で 5HT を投与するとゆっくりとした内向き電流応答を発生する細胞では、TEA 存在下では 5HT 応答の最中にスパイク幅が増大するが、TEA 成分を含まない *Aplysia* 人工血液中ではほとんどスパイク幅が変化しないことが示された。TEA 存在下で 5HT によりスパイク幅が増大することは Kandel 等によっても報告されており⁴⁾、彼らはこの効果は 5HT により電位依存性の K^+ チャンネルが閉じるためスパイク幅が増大すると考えている。しかしながら、われわれは 5HT で発生する内向き電流は、 K^+ チャンネルの closing

が主たる原因ではなく、電位依存性の Na^+ チャンネルの opening が主たる原因であることを確かめた⁶⁾。Kirk 等も同様の結果を報告している¹⁰⁾。また、もしそうならば normal media 中で $+10$ mV までの脱分極パルスをかかけたときには、5HT 存在下では、脱分極で発生する外向き K^+ 電流は減少するはずである。しかしながら、われわれの得た結果では全く逆に K^+ 電流は増大した (Fig. 2A)。一方、TEA 存在下で Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流をブロックすると、Kandel 等の言うように、確かに外向き電流は 5HT で減少した。しかしながら、この見掛け上の外向き電流の減少は、 Ca^{2+} チャンネルブロッカーの 0.3 mM Cd^{2+} で抑制された。この濃度の Cd^{2+} は他の電流には無効なので、TEA 存在

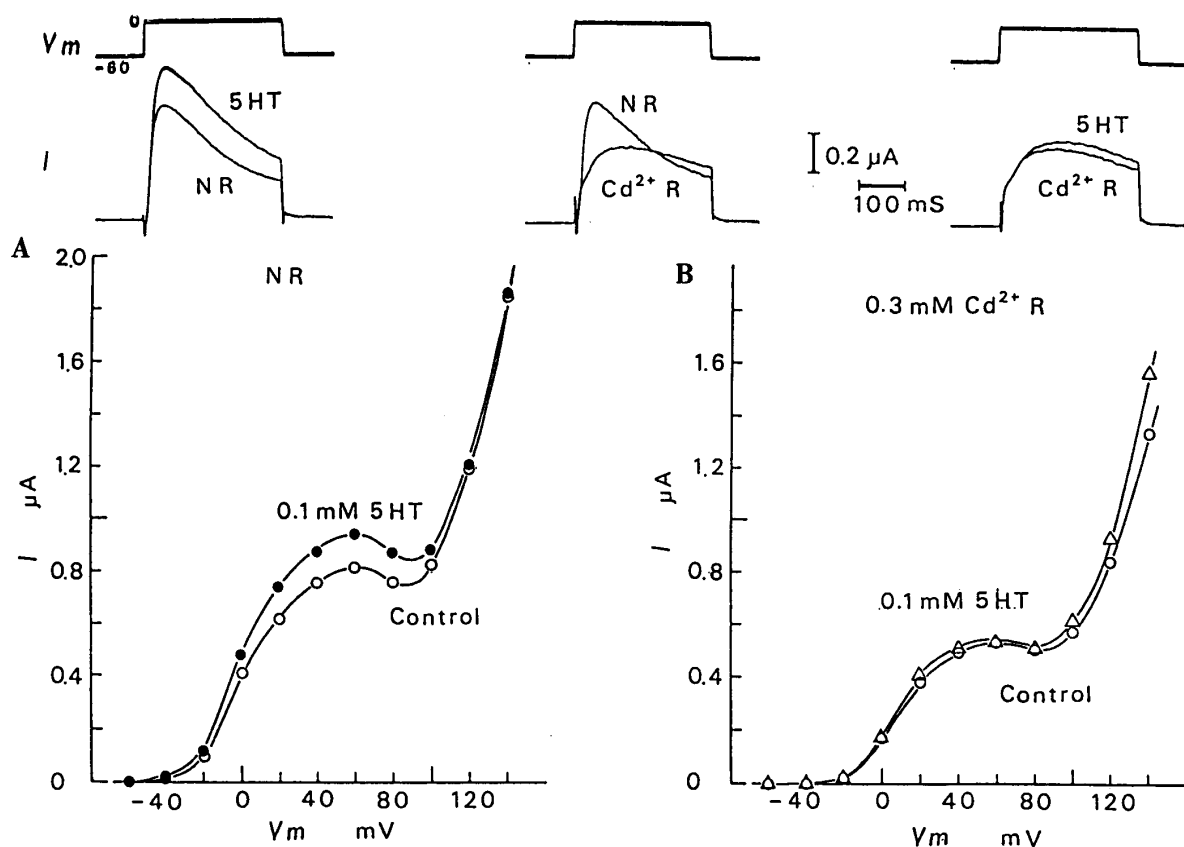


Fig. 3 I(current)-V(voltage) curves of the outward currents measured 150 ms after onset of the depolarizing pulses from -60 mV to various membrane potentials indicated. **A**: I-V curves obtained in normal media in the absence and in the presence of 0.1 mM 5HT. 5HT augmented the N shape portion of the curve. **B**: I-V curves taken in the presence of 0.3 mM Cd^{2+} . Application of 5HT did not influence the I-V curve. Three top traces are example of the outward current recorded in the perfusing media indicated.

下の 5HT による見掛け上の外向き電流の減少は、実際には 5HT で Ca^{2+} 電流が増大していることを反映したものと考えざるを得ない。すなわち、5HT は静止膜で Na^{+} 電流を発生して脱分極応答を引き起こすことに加えて、脱分極パルスをかけたときに発生する Ca^{2+} 電流を増大するということが示唆される。

このことは、 $I_{\text{depol}}-V_m$ curve に対する 5HT の作用からも支持される。脱分極パルスの大きさをいろいろと変えて、 $I_{\text{depol}}-V_m$ curve を測定してみると、その曲線は N 字型の“こぶ”をもった特性を示した。Meech 等によってこの“こぶ”の部分のほとんどは Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流であることが示されている⁹⁾。われわれの実験では 5HT 投与したとき、この“こぶ”の部分だけが增大した。さらに、この“こぶ”の部分

は薄い濃度の TEA で全く消失し、それと同時に 5HT による $I_{\text{depol}}-V_m$ curve の変化も見られなくなった。したがって、脱分極で発生する外向き電流の多くは Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流であり、5HT はこれを増大していると考えられる。ただし、この機構としては 5HT が、(1) Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流を直接増大する、(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大させて二次的に Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流を増大する、(3) あるいはその両方を増大する、などの可能性が考えられる。本実験において、TEA で Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネルをブロックしたとき、脱分極で発生する電流は、5HT によって内向きに変化した。さらに Cd^{2+} を加えて Ca^{2+} チャンネルをもブロックしたときには、もはや 5HT は脱分極で発生する電流に対しほとんど影響を与えなかった。したがって、TEA

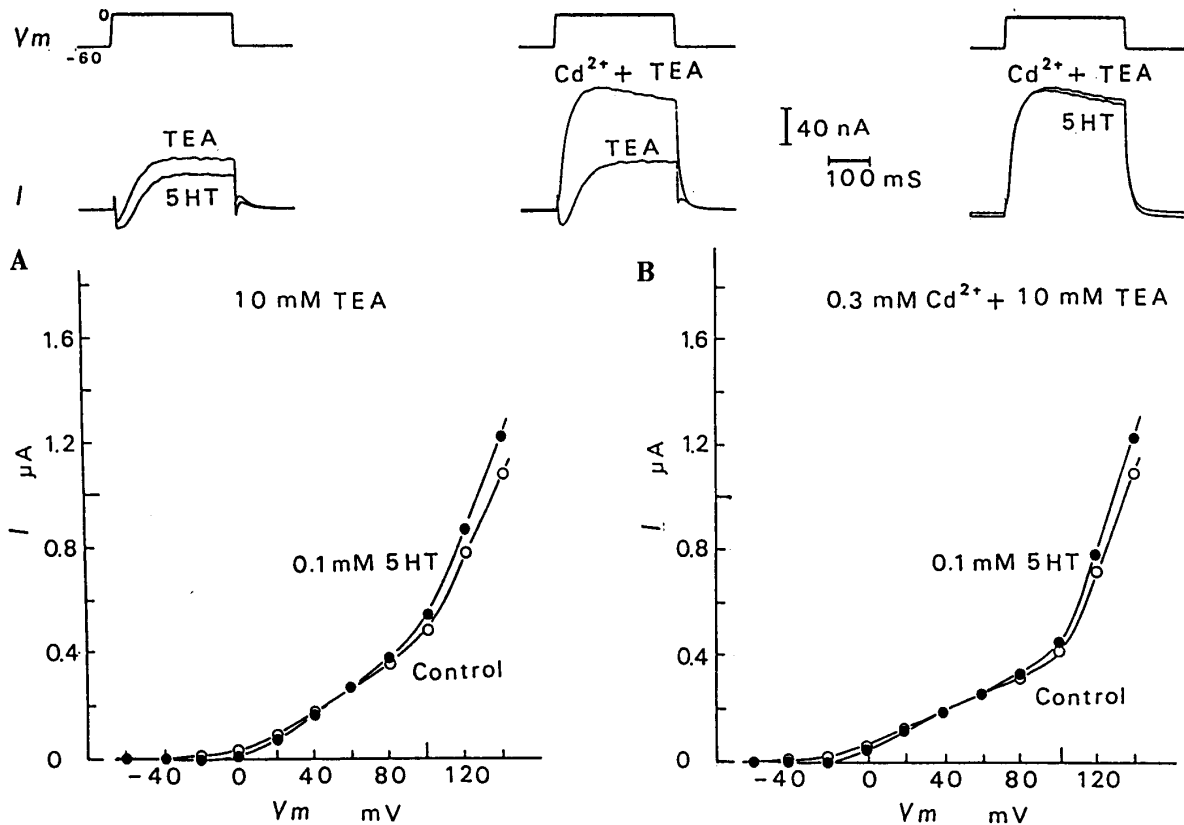


Fig. 4 Effect of 5HT on the I-V curves in 10 mM TEA media (A) and in 0.3 mM Cd^{2+} + 10 mM TEA media (B). **A**: TEA markedly reduced the N shape portion of the I-V curve. At potentials below about +60 mV, 5HT rather changed the I-V curve inwardly. **B**: The addition of Cd^{2+} to TEA increased the current at potentials below about +60 mV as compared with TEA alone. Application of 5HT influenced the curve very little. Three top traces are example of the outward current recorded in the perfusing media indicated.

存在下での 5HT による内向きの電流変化は、5HT が電位依存性の Ca^{2+} 電流を増大させたことが主な原因と考えられる。ただし、その Ca^{2+} 電流の増大量は、*Aplysia* 人工血液中での 5HT による Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流の増大量に対して約 10 倍小さいことから、5HT は Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネルをも開きやすくしている可能性も残されている。以上のことから、normal media 中では、5HT 投与でスパイク幅が広がらないこと、その理由は脱分極時 Ca^{2+} 電流が流入し細胞内 Ca^{2+} 濃度が増大する結果、 Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流が発生して、膜電位を過分極方向に引き戻すためであることが明らかになった。

細胞終末においては、スパイク幅が広がれば Ca^{2+} 流入とそれによって引き起こされる伝達物質の放出が増大すると考えられている。しかしながら、本実験結果により、5HT でスパイク幅が見かけ上広がらなくても Ca^{2+} 流入が増大し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇して伝達物質の放出が増大していることが示唆された。さらに、5HT で Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流が増大することは、伝達物質の放出に feedback をかけるためのひとつの機構にもなっているとも言える。

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご助言をいただいた岩手医科大学医学部生理学第一講座の佐藤誠教授はじめ教職員諸兄に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) 千葉 修、佐々木和彦、樋口浩文、他：異なる G 蛋白の活性化がスパイク幅に及ぼす影響、日本生理誌、53、455、1991
- 2) 千葉 修、樋口浩文、川崎 敏、他：受容体と関連した 2 種類の異なる G 蛋白によるスパイク幅の拮抗的調節作用、岩手医誌、45、71-83、1993
- 3) Kawasaki, S., Chiba, O., Higuchi, H. et al.: Intracellular Mechanism for Augmenting Effect of Serotonin on the Depolarization-induced Outward Currents Recorded from the Ganglion Cells of *Aplysia*, Jpn. J. Physiol., 43, S168, 1993.
- 4) Abrams, T. W., Castellucci, V. F., Camardo, J. S. et al.: Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by presynaptic facilitation involving cyclic AMP-dependent closure of a serotonin-sensitive potassium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 7956-7960, 1984.
- 5) Frazier, W. T., Kandel, E. R., Kupfermann, I. et al.: Morphological and functional properties of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. J. Neurophysiol. 30, 1288-1351, 1967.
- 6) Kudo, A., Sasaki, K., Tamazawa, Y. et al.: A slow voltage-dependent Na^+ -current induced by 5-hydroxytryptamine and the G-protein-coupled activation mechanism in the ganglion cells of *Aplysia*. Jpn. J. Physiol. 41, 259-275, 1991.
- 7) Sasaki, K. and Sato, M.: A single GTP-binding protein regulates K^+ -channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine receptor. Nature 325, 259-262, 1987.
- 8) Adams, P. R., Constanti, A., Brown, D. A. et al.: Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrates sympathetic neurons. Nature 296, 746-749, 1982.
- 9) Meech, R. W. and Standen, N. B.: Potassium Activation in *Helix Aspersa* Neurones under Voltage Clamp: a Component Mediated by Calcium Influx, J. Physiol, 249, 211-239, 1975.
- 10) Kirk, M. D., Taussig, R., and Scheller, R. H.: Egg-laying hormone, serotonin, and cyclic nucleotide modulation of ionic currents in the identified motorneuron B16 of *Aplysia*. J. Neurosci. 8, 1181-1193, 1988.