

氏 名（本籍） 白 崎 哲 哉

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 1 3 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 3 月 27 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
（ 博 士 課 程 ） 病 態 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Direct modulation of affinity of GABA_A
receptor by intracellular ATP in dissociat-
ed nucleus tractus solitarii neurones of rat
（ ラ ッ ト 延 髓 孤 束 核 の 急 性 単 離 神 經 細 胞 に お い
て GABA_A 受 容 器 の 親 和 性 は 細 胞 内 ATP に よ
り 直 接 制 御 さ れ る ）

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 赤 池 紀 生 教 授 渡 辺 建 彦

教 授 丹 治 順

論文内容要旨

GABA は哺乳動物の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質であり、GABA 作動性の抑制性神経伝達機構が崩れると痙攣などの疾病の原因となる。GABA 受容器のうち GABA_A 受容器はバルビツール酸受容器およびベンゾジアゼピン受容器とともに Cl⁻チャンネルと複合体を形成し、抗痙攣薬、睡眠剤、抗不安薬、ビククリン、ストリキニンやキノロン剤など多くの薬物により細胞外から修飾されることが現在までに詳しく調べられている。しかしながら細胞内からの GABA_A 受容器の修飾については、GABA_A 受容器のβサブユニットの細胞質側に cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (PKA) や Ca²⁺/リン脂質依存性蛋白リン酸化酵素 (PKC) の基質となる部分があることが知られているにもかかわらずよくわかっていない。そこで ATP, Ca²⁺ および cAMP による細胞内からの GABA_A 受容器機能の修飾について急性単離したラットの延髄孤束核ニューロンにパッチクランプ法と Y-チューブ法を適用し、GABA が惹起する脱感作前の正確な Cl⁻ 電流を指標として定量的に検討した。

【方 法】

1 から 3 週令の Wistar ラットをエーテル麻酔下に断頭し、孤束核を含む厚さ 350 μm の脳薄切片を作成した。この脳薄切片を 1000unit/ml のディスパーゼ (合同酒精) にて酵素処理した後、実体顕微鏡下に孤束核をパンチアウトし、微小ピペットにて機械的に神経細胞を単離した。膜電流の記録は whole-cell 様式のパッチクランプ法にて膜電位固定 (保持電位 -50mV) 下に室温にておこない、細胞外からの薬液投与には Y-チューブ法 (細胞周囲の細胞外液を 10 から 20 ミリ秒以内に急速交換できる) を用いた。細胞内からの薬液投与はパッチ用ガラス電極からの拡散によった。

【結 果】

細胞内 ATP (ATPi) 存在下、GABA は濃度依存性に Cl⁻ 電流を惹起した。その閾値は 0.3 μM, 解離定数 (K_D) は 9.1 μM で、Hill 係数は 1.47 であった。しかし ATPi が不在条件下では GABA が惹起する膜電流のピーク値が時間と共に減弱 (run-down) した。この run-down を防ぐには 2 mM 以上の ATPi が必要であった。細胞内に cAMP を投与しても、また細胞外から 8-Br-cAMP や dibutyl cAMP を投与しても GABA 応答に影響せず、その run-down にも影響を与えなかった。また、L-型カルシウムチャンネルやグルタミン酸受容器 (NMDA 型と non-NMDA 型を含む) を活性化し、細胞内 Ca²⁺ 濃度を高めても GABA 応答は抑制されなかった。

alkaline phosphataseを細胞内に投与し、脱リン酸化反応を促進させても run-down は促進されず、逆にオキサダ酸により細胞内の phrotein posphatase による脱リン酸化反応を抑制しても run-down は防止できなかった。GABA 応答の逆転電位は Cl^- の平衡電位に一致し、これは run-down により変化しなかった。run-down 中の GABA 応答抑制は膜電位依存性を示さず、GABA 応答の用量-反応曲線を最大反応値を変えずに右側（高濃度側）にシフトした。ATP のほか ADP と ATP γ S も GABA 応答を維持できたが、AMP、アデノシン AMP-PNP、ADP β S および GTP は GABA 応答を維持できなかった。低濃度の GABA およびペントバルビタールにより惹起される Cl^- 電流も ATPi 除去により run-down したが、グリシンおよびグルタミン酸応答は影響されなかった。

【考 察】

本研究により、ラット延髄孤束核では細胞内の ATP がリン酸化過程によらず、ある種の ATP レセプターを介して GABA_A 受容体の親和性を細胞の内側から直接制御していることが示唆された。カエルの脊髄後根神経節細胞やラット小脳のプルキンエ細胞で観察されるような Ca^{2+} による GABA_A 受容体の直接制御は本標本では観察されなかった。また、GABA_A 受容体のリン酸化および脱リン酸化によりその応答が抑制または促進されるとの報告が最近みられるが、本標本では GABA_A 受容体応答に影響しなかった。このことは、細胞内からの GABA_A 受容体の制御機構が GABA_A 受容体を構成するサブユニットの違いにより異なる可能性を示唆するかもしれない。事実、リン酸化部位の有無やリン酸化される酵素がサブユニットのサブタイプにより異なることが生化学的に指摘されている。今後の詳細な検討が必要であろう。本研究で観察された細胞内 ATP による GABA 応答の制御は生理的にはシナプス可塑性の機序の 1 つとして働き、また、病態生理学あるいは病的には痙攣や痴呆、神経細胞死の機序となりうると思われる。

審査結果の要旨

中枢神経系において外界からの情報の受容、識別、統合、処理やその出力はすべてシナプス伝達を介しておこなわれる。その主役である化学受容体の機能修飾やその異常は生理機能の変化や病態の発現に直接・間接的に関与する。これまでに GABA_A 受容体の細胞外からの制御機構については数多くの研究があったが、細胞内からのそれについては不明な点が多かった。

本論文で、著者は急性単離したラットの延髄孤束核ニューロンに whole-cell 様式のパッチクランプ法と Y-チューブ式急速外液交換法を適用し、高エネルギーリン酸供与体の ATP および細胞内 2 次メッセンジャーである Ca²⁺ と cAMP による細胞内からの GABA_A 受容体の機能的修飾について詳細に検討し、以下の結果を得た。

1. Ca²⁺ と cAMP は GABA_A 受容体機能に直接影響を与えない。2. ATP が①加水分解・リン酸化機構によらず、②ある種のプリンレセプターを介して直接に、③ GABA_A 受容体の親和性を制御する。ところで、Wong らと Gyenes らも細胞内 ATP の除去により GABA 受容体応答が run-down することを報告しているが、彼らはその機序として GABA_A 受容体の脱リン酸化を考えており、これは本論文の結果と根本的に対立する。著者はアルカリフォスファターゼとオキサ酸を用いた脱リン酸化過程の修飾実験と、ATP アナログを用いた構造活性相関の検討からアデニンと β リン酸部分に親和性のある未知のプリン受容体の存在を示唆するとともに、GABA_A 受容体の親和性低下が GABA_A 受容体応答の run-down の本質であることを明確に証明し、Wong らの考えに科学的に反論した点でも評価が大きい。

この細胞内 ATP による GABA_A 受容体の修飾機構は生理的には興奮性シナプス伝達の効率を上げ、シナプスの可塑性に関与すると考えられる。また、生理的範囲を越えた過度な興奮性シナプス伝達や脳虚血に起因する急激な細胞内 ATP 量の減少は神経細胞死を促進するであろう。本実験においては、他の脳部位や末梢神経細胞で報告されたような細胞内 Ca²⁺ および cAMP による GABA_A 受容体機能抑制作用は見られていない。このことは、細胞内からの GABA_A 受容体機能制御機構が脳部位により異なる可能性を示す。よって、本論文の結果を哺乳動物中枢神経系のすべての部位に即座に適用することはできないが、今後上記の仮説に基づいた広範な研究がさらに必要と思われる。

本研究で得た成果は、細胞生理学の範囲を越えた意義の高い研究であり、今後の脳生理学の発展に大きく貢献すると考えられ、学位授与に値するものと認める。