

Title	EFFECT OF $\gamma$ -VINYL $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID ON THE $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR-COUPLED CHLORIDE ION CHANNEL IN VESICLES FROM THE BRAIN OF THE RAT.
Author(s)	鈴木, 保宏
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38534">https://hdl.handle.net/11094/38534</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	すず 鈴 木 やす 保 ひろ 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 8 2 2 号
学位授与年月日	平成 5 年 5 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	EFFECT OF $\gamma$ -VINYL $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID ON THE $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID RECEPTOR-COUPLED CHLORIDE ION CHANNEL IN VESICLES FROM THE BRAIN OF THE RAT. ( $\gamma$ -vinyl GABA のラット脳内 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体共役型 Cl <sup>-</sup> チャンネルへの影響)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎  (副査) 教授 津本 忠治 教授 遠山 正彌

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

脳内における主要な抑制性神経伝達物質の一つとされる  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は, GABA 受容体に結合すると後シナプス膜の chloride (Cl<sup>-</sup>) 透過性が増大し, 抑制性シナプス後電位が発生する。GABA トランスアミナーゼ (GABA 分解酵素) の選択的, 非可逆的阻害剤である  $\gamma$ -vinyl GABA は, 最近抗てんかん薬として臨床上使用されている。しかし, この抗てんかん作用は脳内の GABA 濃度の変動とは必ずしも相関せず, その機序は不明な点が多い。今回,  $\gamma$ -vinyl GABA の神経薬理学的作用の解明の手がかりとして GABA 受容体共役型 Cl<sup>-</sup>チャンネルへの影響を <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> influx assay を用いて検討した。

#### [方法ならびに成績]

雄 Sprague-Dawley ラット (180-200g) の大脳皮質より Obata and Yamamura の方法に従い membrane vesicles を調製した。membrane vesicles への <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の uptake を Obata and Yamamura の方法に準じて測定した。membrane vesicles を  $\gamma$ -vinyl GABA と 30°C でプレインキュベーションした後, <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> (0.1  $\mu$ Ci) 単独あるいは <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>+GABA (50  $\mu$ M) を加え, <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の membrane vesicles への uptake を開始した。開始 4 秒後に, 氷冷緩衝液を加え <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の uptake を停止させ, すぐにグラスファイバーフィルターを用いて吸引濾過した。フィルターに残存する membrane vesicle に uptake された <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の放射活性を液体シンチレーション法により測定した。GABA 存在下での <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の uptake 量 (total uptake) から GABA 非存在下での <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の uptake 量 (basal uptake) を差し引き, GABA により増大された <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の uptake 量 (net uptake) を算出した。

まず最初に,  $\gamma$ -vinyl GABA のプレインキュベーション時間による <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake の変化を明らかにするため, 1 mM の  $\gamma$ -vinyl GABA 存在下でプレインキュベーション時間 0 秒から 10 分までの <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake を測定した。プレインキュベーションしない (プレインキュベーション時間 = 0 秒, すなわち  $\gamma$ -vinyl GABA を <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> あるいは <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>+GABA と同時に加える) 状態では,  $\gamma$ -vinyl GABA は <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の basal uptake 及び net uptake には影響しなかった。しかし, <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> の net uptake はプレインキュベーション開始後急激に減少し約 1 分で一定に達した。一

方,  $^{36}\text{Cl}^-$  の basal uptake は変化を認めなかった。

次に, membrane vesicles を 1-1000  $\mu\text{M}$  濃度の  $\gamma$ -vinyl GABA と 10 分間プレインキュベーションし  $\gamma$ -vinyl GABA 濃度の  $^{36}\text{Cl}^-$  uptake への影響を調べた。 $\gamma$ -vinyl GABA は 100-1000  $\mu\text{M}$  の濃度下で  $^{36}\text{Cl}^-$  の net uptake を濃度依存性に抑制したが, basal uptake には影響しなかった。

membrane vesicles を  $\gamma$ -vinyl GABA (1 mM) の存在下あるいは非存在下で 10 分間プレインキュベーションした後,  $^{36}\text{Cl}^-$  と同時に 0-1000  $\mu\text{M}$  の GABA を加え,  $\gamma$ -vinyl GABA の GABA concentration-response curve への影響を調べた。 $\gamma$ -vinyl GABA は GABA の  $^{36}\text{Cl}^-$  uptake 増大効果 (net uptake) を  $\text{ED}_{50}$  の変化を伴わずに抑制した。

$\gamma$ -vinyl GABA (1 mM) とプレインキュベーションした後, 洗浄 (遠心分離 3 回) することにより, この  $\gamma$ -vinyl GABA の net uptake 抑制効果は可逆的に消失した。このことは,  $\gamma$ -vinyl GABA が GABA トランスアミナーゼ抑制作用 (非可逆的) を介しないで,  $^{36}\text{Cl}^-$  の net uptake を可逆的に抑制することを示唆している。

[総括]

100-1000  $\mu\text{M}$  の  $\gamma$ -vinyl GABA でプレインキュベーションすることにより, GABA による  $^{36}\text{Cl}^-$  uptake の増大効果が非競合的に抑制された。 $\gamma$ -vinyl GABA が GABA 受容体/ベンゾジアゼピン受容体/ $\text{Cl}^-$  チャンネル複合体に GABA の非競合的アンタゴニストとして作用する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

$\gamma$ -Vinyl GABA (一般名 Vigabatrin) は中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質である GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) のアナログとして理論的に合成開発された薬剤である。この薬剤は抗てんかん薬として既に臨床使用され, 小児科領域でも複雑部分発作症例, 更には小児難治性てんかんである點頭てんかん症例においてもその有効性が注目されている。この抗けいれん作用は  $\gamma$ -vinyl GABA が GABA 分解酵素である GABA トランスアミナーゼを阻害し脳内の GABA 濃度を増加させることにより説明されている。

本論文では, ラット大脳皮質より調整した membrane vesicles を材料として  $\gamma$ -vinyl GABA の  $\text{GABA}_A$  受容体共役  $\text{Cl}^-$  チャンネルへの影響を  $^{36}\text{Cl}^-$  influx assay を用いて biochemical に検討している。実験結果から  $\gamma$ -vinyl GABA が直接  $\text{GABA}_A$  レセプター複合体に GABA の非競合的アンタゴニストとして働くことが示され,  $\gamma$ -vinyl GABA がけいれん誘発作用をも同時に有している可能性が示唆された。

今回得られた  $\gamma$ -vinyl GABA の神経薬理学的作用はこれまでに報告されておらず重要な知見であり, 学位授与に相当する成果であると考えられる。