

Title	The effect of a point mutation of the $\beta 2$ subunit of GABAA receptor on direct and modulatory actions of general anesthetics
Author(s)	深見, 栄
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41611
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"〉 大阪大学の博士論文について <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	深見 栄
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14533 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	The effect of a point mutation of the β_2 subunit of GABA _A receptor on direct and modulatory actions of general anesthetics. (GABA _A 受容体 β_2 サブユニットの点変異が全身麻酔薬の直接作用と修飾作用に及ぼす影響)
論文審査委員	(主査) 教授 真下 節 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 吉矢 生人

論文内容の要旨

【目的】

中枢性 GABA_A受容体は、麻酔薬や鎮静薬の重要な作用部位として注目されている。GABA_A受容体には α , β , γ , δ , ρ , ϵ といったサブユニットがあり、現在までに19の遺伝子が見つまっている。GABA_A受容体はこれらサブユニットを組み合わせた5量体といわれている。麻酔薬や鎮静薬がこれらサブユニットのどの部位に作用するかについては多くの研究がなされているが、いまだ不明な点が多い。全身麻酔薬は、高濃度で GABA_A受容体の Cl⁻チャネルを直接開く直接作用と低濃度で GABA による Cl⁻電流を増強する修飾作用を持つ。1993年の Nature 誌に GABA_A受容体 β_2 サブユニットのN末端にある Tyr¹⁵⁷を Phe に変異すると受容体の GABA に対する感受性が低下するが、ペントバルビタールの直接作用における感受性には変化がなく、この部位が GABA の作用部位としては重要だが、ペントバルビタールの直接作用には関連がないという論文が報告された。我々は、 α_1 , β_2 , γ_2s のサブユニットを組み合わせた受容体と α_1 , Tyr¹⁵⁷を Phe に変異した β_2 , γ_2s のサブユニットを組み合わせた受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、GABA の作用部位として重要な β_2 サブユニット Tyr¹⁵⁷の変異による他の静脈麻酔薬、プロポフォールとエトミデイトの直接作用とペントバルビタール、プロポフォール、エトミデイトの修飾作用に対する影響について電気生理学的に調べた。

【方法】

マウスの GABA_A受容体 α_1 , β_2 , γ_2s のサブユニット cDNA と PCR 法にて Tyr¹⁵⁷を Phe に変異した β_2 サブユニット cDNA を transcription vector (pBluescriptMXT) にサブクローンした。制限酵素で各々の cDNA を直線化して鋳型 DNA を得、T3 RNA polymerase で capped mRNA を作成した。アフリカツメガエルの成熟卵母細胞に、 α_1 , β_2 , γ_2s または α_1 , 変異 β_2 , γ_2s サブユニットの mRNA を同量に注入し、ND96溶液 (pH7.5) 中で48から72時間20℃で培養した。その後、卵母細胞を還流装置にてカエルリンガー液で還流しながら二電極電位固定法で電気生理学的に反応を測定した。麻酔薬をカエルリンガー液に溶解し還流液と共に卵母細胞に投与して受容体が活性化されることによって起こる Cl⁻電流 (最高値) を測定した。麻酔薬の直接作用に関しては GABA とそれぞれの麻酔薬の α_1 , β_2 , γ_2s と α_1 変異 β_2 , γ_2s 受容体における用量反応曲線を作成し、その ED₅₀により変異した β_2 による麻酔薬の感受性の変化を調べた。修飾作用に関しては、低濃度 (臨床濃度) 各種麻酔薬の GABA (ED₅₀) による

電流の増強効果に対する変異 β_2 の影響を調べた。

【成績】

高濃度麻酔薬の受容体に対する直接作用については、変異した β_2 はプロポフォールの用量反応曲線 (ED_{50}) を GABA ほど ($20.3 \pm 2.1 \rightarrow 1845.0 \pm 62.6 \mu\text{M}$) ではないが、右方へ偏位させた ($24.0 \pm 4.7 \rightarrow 80.1 \pm 7.9 \mu\text{M}$)。他の麻酔薬については変異による影響は見られなかった (ペントバルビタール: $325.0 \pm 31.6 \rightarrow 320.0 \pm 8.9 \mu\text{M}$, エトミデイト: $11.2 \pm 0.97 \rightarrow 13.5 \pm 0.88 \mu\text{M}$)。低濃度麻酔薬の GABA による電流を増強する修飾的作用については、すべての麻酔薬において変異した β_2 による影響は見られなかった。

【総括】

麻酔薬の GABA_A 受容体への直接作用において、GABA の作用部位として重要な β_2 サブユニットの Tyr¹⁵⁷ はプロポフォールの作用部位にも関連するが、その変異による影響は GABA の作用に見られるほどではなく、GABA とプロポフォールの作用機序は異なっていると考えられる。また、ペントバルビタール、エトミデイトは Tyr¹⁵⁷ の変異で影響を受けなかったため、これらの麻酔薬の作用機序も GABA やプロポフォールとは異なる。麻酔薬の修飾的作用において、Tyr¹⁵⁷ の変異による影響は各麻酔薬でみられず、この部位はこれら麻酔薬の修飾的作用とは関連がない。

論文審査の結果の要旨

本研究は麻酔薬や鎮静薬の作用部位として注目されている GABA_A 受容体について、麻酔薬の作用発現に重要な部位を分子生物学的手法を用いて電気生理学的に調査した研究である。

全身麻酔薬の作用は二つあり、高濃度で GABA_A 受容体に直接作用して Cl⁻ チャンネルを開く直接作用と低濃度で GABA により開いた Cl⁻ チャンネルの電流を増強する修飾作用とを持つ。GABA の作用部位として重要な GABA_A 受容体 β_2 サブユニット N 末端の Tyr¹⁵⁷ の変異が麻酔薬 (ペントバルビタール、プロポフォール、エトミデイト) のこの二つの作用に与える影響を調べた。直接作用に関しては、 β_2 サブユニット Tyr¹⁵⁷ の変異はプロポフォールの感受性を低下させたが GABA ほどではなく、プロポフォールと GABA の作用機序は異なっていることが示唆された。ペントバルビタール、エトミデイトの感受性については変異による影響はみられず、これら麻酔薬の作用機序も GABA やプロポフォールとは異なる。修飾作用に関しては、Tyr¹⁵⁷ の変異による影響は各麻酔薬でみられず、この部位はこれら麻酔薬の修飾作用とは関連がない。

麻酔のメカニズムについてはいまだ不明な部分が多いが、GABA_A 受容体は臨床濃度の麻酔薬が作用を発現する部位として注目されている。麻酔薬の GABA_A 受容体に対する直接作用に関して、プロポフォールの作用部位は GABA や他の麻酔薬とは異なる部位が関連すること、そして修飾作用に関しては、各麻酔薬の作用部位は直接作用や GABA の作用部位とは異なることを本研究は明らかにした。これは麻酔のメカニズム解明において意義あることであり、学位論文に値すると思われる。